Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur der 16S rRNA im Bindungsbereich des ribosomalen Proteins S4 von **Escherichia coli**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ernst Ungewickell
aus Berlin

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549013_0004

Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur der 16S rRNA im Bindungsbereich des ribosomalen Proteins S4 von **Escherichia coli**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ernst Ungewickell
aus Berlin

1976

1. Gutachter: Professor Dr. H. G. Wittmann

2. Gutachter: Professor Dr. E. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung 1

1. Funktion der Ribosomen 1
2. Struktur der Ribosomen 2
3. Die Struktur der RNA unter besonderer Berücksichtigung der rRNA von E. coli 4
4. Lokalisation der Bindungsorte von primären ribosomalen Bindungsproteinen auf der 16S RNA 10

B. Hauptteil I: Native und denaturierte Formen der 16S RNA 15

1. Einführung 16
2. Materialien und Zusammensetzung häufig verwendeter Pufferlösungen 17
3. Methoden 18

3.1 Bakterienstamm 18
3.2 Isolierung der 30S Untereinheiten 18
3.3 Isolierung der ribosomalen Proteine 18
3.4 Extraktion der ribosomalen RNA aus 30S Untereinheiten 19
3.4.1 Phenolextraktion 19
3.4.2 Ätherextraktion und Äthanolfällung 19
3.4.3 Aufbewahrung der RNA 19
3.4.4 Überprüfung der RNA Qualität 20
3.5 Konzentrationsbestimmungen 20
3.6 Renaturierung und Denaturierung von 16S RNA 20
3.7 Bindungsexperimente mit S4 21
3.7.1 Standard-Testansatz 21
3.7.2 Abweichender Testansatz 21
3.7.3 Entfernung nicht gebundener Proteine 21
3.8 Agarose-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen 22
3.8.1 Präparation der kombinierten Agarose-Polyacrylamid-Gelplatten 22
3.8.2 Durchführung der Gel-Elektrophorese 22

Seite

3.8.3 Spezifische Färbemethoden für RNA und Protein 23

3.9 Enzymatische Hydrolysen 23

3.9.1 Hydrolysebedingungen 23

3.9.2 Polyacrylamidgel-Elektrophoresen zur Fraktionierung der Hydrolysate 23

3.10 Hyperchromizitätsmessungen 24

3.11 Fluoreszenzmessungen 25

3.12 Sedimentationsuntersuchungen 26

4. Resultate 27

4.1 Konformationen der 16S RNA 27

4.2 Bindungsexperimente mit dem Protein S4 27

4.3 Hydrolyse mit trägergebundener RNase A 32

4.4 Zugänglichkeit der doppelhelikalen RNA-Bereiche in verschiedenen 16S RNA Konformationen für Ethidium-Bromid 33

4.5 Der Verlauf der thermischen Denaturierung verschiedener 16S RNA Konformationen 34

4.6 Sedimentationsuntersuchungen 34

5. Diskussion 37

5.1 Die Bedeutung der 16S RNA Konformationen für die spezifische Wechselwirkung der RNA mit dem Protein S4 37

5.2 Zugänglichkeit einzelsträngiger und doppelhelikaler RNA-Bereiche in denaturierter und renaturierter 16S RNA 39

5.3 Vergleich der Hyperchromizität von nativer und denaturierter 16S RNA 41

5.4 Sedimentationsverhalten der verschiedenen 16S RNA Konformationen 42

5.5 Eigenschaften von 16S RNA, die unter denaturierenden Bedingungen aus 30S Untereinheiten extrahiert wird 42

5.6 Mögliche Funktion der Magnesium-Ionen 42

Seite

C. Hauptteil II: Charakterisierung des spezifischen Bindungsortes von S4 auf der 16S RNA 45

1. Einführung 46
2. Materialien 47
3. Methoden 48

3.1 Präparation von ^{32}P radioaktiv markierter rRNA 48
3.1.1 Bakterienstamm 48
3.1.2 Wachstumsbedingungen 48
3.1.3 Isolierung der rRNA 48
3.2 Hydrolysen mit T_1-RNase 49
3.2.1 Renaturierung der rRNA und Komplexbildung 49
3.2.2 Hydrolysebedingungen 49
3.2.3 Polyacrylamidgel-Elektrophoresen zur Fraktionierung der Hydrolysate 50
3.2.4 Anfertigung von Autoradiogrammen 50
3.3 Hydrolysen mit trägergebundener RNase A 51
3.3.1 Renaturierung der RNA und Komplexbildung 51
3.3.2 Hydrolysebedingungen 51
3.3.2.1 Standardhydrolysen 51
3.3.2.2 Andere Hydrolysebedingungen 51
3.3.3 Fraktionierung der Hydrolysate 51
3.3.3.1 Polyacrylamidgel-Elektrophoresen 51
3.3.3.2 Gelfiltration 52
3.3.3.3 Zentrifugation in Sucrosegradienten 52
3.4 Fraktionierung von [^{32}P] RNA Subfragmenten in Polyacrylamidgel-Platten 53
3.4.1 Denaturierung der RNPs und RNA-Fragmente 53
3.4.2 Elektrophoresen in Harnstoff-Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgel-Platten 53
3.5 Extraktion ^{32}P radioaktiv markierter S4 Fragmente 54
3.5.1 Elution intakter S4-RNA Fragmente und RNPs 54
3.5.2 Extraktion von RNA Fragmenten mittels Phenol 54
3.5.3 Elektrophoretische Elution der RNA 54
3.6 Anfertigung von Oligonukleotidkarten 55

Seite

3.7 Deproteinisierung von spezifischen [^{32}P] RNPs 55

3.7.1 Natriumlaurylsulfat-Methode 55

3.7.2 Phenolextraktion 56

3.7.3 Trypsinbehandlung 56

3.8 Partielle Denaturierung der RNA Fragmente mit ansteigenden Harnstoffkonzentrationen 57

3.9 Denaturierung und Rekonstitution der S4-F1 RNA 57

3.10 Rekonstitution des spezifischen Bindungsortes von S4 auf der 16S RNA ("S4-RNA") mit dem Protein S4 58

3.10.1 Rekonstitutionsexperimente mit ^{32}P radioaktiv markierter "S4-RNA" 58

3.10.2 Proteinbindungsexperimente mit nicht radioaktiv markierter "S4-RNA" 58

3.11 Untersuchungen über die Stabilität der "S4-RNA" und S4-RNPs 59

3.11.1 Magnesiumabhängigkeit 59

3.11.2 Temperaturabhängigkeit 59

3.12 Bindungsexperimente mit Ethidium-Bromid 60

4. Resultate

4.1 Kontrollierte enzymatische Hydrolyse spezifischer S4-16S RNA Komplexe und proteinfreier RNA mit T_1 RNase 61

4.1.1 Die Primärstruktur der RNA-Teile von S4 Protein-RNA Fragmentkomplexen (S4-RNPs) und die Positionen der Enzymschnitte 61

4.1.2 Die Primärstruktur der RNA-Teile von S4-S20 RNPs und die Positionen der Enzymschnitte 87

4.2 RNA-RNA Wechselwirkungen zwischen Subfragmenten im Bindungsbereich von S4 und S20 auf der 16S RNA 95

4.2.1 Deproteinisierung des S4-RNPs II 96

4.2.2 Partielle Denaturierung der S4-F1 RNA mit ansteigenden Harnstoffkonzentrationen und Lokalisierung der RNA-RNA Wechselwirkungen 104

4.2.3 Rekonstitution der S4-F1 RNA 110

4.2.4 Analyse großer RNA Fragmente, die aus dem Hydrolysat vorinkubierter 16S und 23S RNA isoliert wurden 111

4.2.5 Deproteinisierung des S4-S20-RNPs I 114

4.2.6 Deproteinisierung des S4-S20-RNPs II (= S20-RNP) 118

Seite

4.3 Hydrolyseuntersuchung mit trägergebundener RNase A 122

4.3.1 Der Bindungsort von S4 auf der 16S RNA 122

4.3.2 Hydrolyse der RNA spezifischer S20-16S RNA und S4-S20-16S RNA Komplexe 131

4.4 Methoden zur quantitativen Isolierung des Bindungsortes von S4 auf der 16S RNA 132

4.5 Stabilität der S4-RNA und S4-RNPs während der Lagerung 138

4.6 Optimale Inkubationstemperatur und -zeit für die Rekonstitution der S4-RNA Fragmente mit dem Protein S4 141

4.7 Die thermische Stabilität der S4-RNA und des S4-RNPs 142

4.8 Der Einfluß der Proteine S4, S20 und L19 auf den Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von 16S RNA und S4-16S RNA Komplexen 144

4.9 Die Zugänglichkeit der S4-RNA und S4-RNPs für den Farbstoff Ethidium-Bromid 146

5. Diskussion 148

5.1 Beschreibung der S4- und S4-S20 RNPs, die mit T_1 gewonnen wurden 148

5.2 Spezifische RNA-RNA Wechselwirkungen 149

5.3 Lokalisierung spezifischer RNA-RNA Fernwechselwirkungen in der 5'-Hälfte der 16S RNA 151

5.4 Hydrolyseuntersuchungen mit trägergebundener RNase A 152

5.5 Der Einfluß der Proteine S4, S20 und L19 auf die RNase-Resistenz der $S4\text{-}RNA_{panc.}$ und $S4\text{-}RNPs_{panc.}$ 153

5.6 Ein Vergleich der hypothetischen Sekundärstruktur der 16S RNA im Bindungsbereich von S4 mit den Positionen der Enzymschnitte 155

5.7 Quantitative Isolierung des Bindungsortes von S4 160

5.8 Rekonstitution der S4-RNA mit dem Protein S4 und die thermische Stabilität der S4-RNA und S4-RNPs 161

5.9 Schlußfolgerungen aus den Farbstoffbindungsexperimenten 164

5.10 Ein Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen anderer Arbeitsgruppen 164

Seite

5.11 Hinweise auf weitere RNA-RNA Fernwechselwirkungen in der 16S RNA 166

5.12 Versuche zur Identifizierung der S4-Bereiche, die mit der 16S RNA in Kontakt stehen 167

5.13 Ausblick 168

D. Zusammenfassung 170

E. Verzeichnis der Abkürzungen 172

F. Literaturverzeichnis 173

Danksagung 182

Lebenslauf 183

A. Einleitung

1. Die Funktion der Ribosomen

Die Übersetzung der genetischen Information aus einer Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz (Translation), die nach den Regeln des genetischen Codes abläuft, findet in allen Organismen an den Ribosomen statt.
Die Ribosomen von Escherichia coli, die am besten charakterisiert sind, besitzen einen Sedimentationskoeffizienten von 70S und setzen sich aus zwei ungleich großen Untereinheiten zusammen, die mit je 50S und 30S sedimentieren. Der Ablauf der Proteinsynthese am Ribosom wird in drei Hauptschritte gegliedert: Initiation, Elongation und Termination.
Während des Initiationsschrittes wird zunächst aus einer 30S Untereinheit, den Initiationsfaktoren (IF-1, IF-2 und IF-3), beladener Initiator-tRNA (f-Met-$tRNA_F^{Met}$) und GTP ein 30S Initiationskomplex geformt. Die Initiator-tRNA tritt in diesem Komplex in direkte Wechselwirkung mit dem Initiationscodon auf der mRNA. Nach der Dissoziation von IF-3 entsteht durch Anlagerung der 50S Untereinheit ein 70S Initiationskomplex. Im Verlauf dieser Reaktion dissoziiert zunächst der Faktor IF-1 und anschließend IF-2 bei gleichzeitiger hydrolytischer Spaltung von GTP in GDP und freiem Phosphat.
Die beladene Initiator-tRNA befindet sich zu Beginn des Elongationsschrittes im Peptidyl-tRNA Bindungsort (p-site) des Ribosoms. Mit der Aminoacyl-tRNA Bindungsstelle (a-site) tritt nun ein ternärer Komplex, der sich aus Aminoacyl-tRNA, dem Elongationsfaktor EF-Tu und GTP zusammensetzt, in Wechselwirkung.
Das Basentriplett, das in 3'-Richtung dem Initiationscodon auf der mRNA benachbart ist, determiniert die tRNA-Spezies des ternären Komplexes. Nach der Hydrolyse des GTPs dissoziiert der binäre Komplex EF-Tu·GDP vom Ribosom.
Die Regenerationsreaktion, EF-Tu·GDP + GTP $\longrightarrow$ EF-Tu·GTP + GDP, wird durch den Faktor EF-Ts katalysiert. EF-Tu·GTP und Aminoacyl-tRNA bilden anschließend einen neuen ternären Komplex.
Das Enzym Peptidyltransferase, das aus einem oder mehreren ribosomalen Proteinen besteht, katalysiert die Knüpfung der Pep-

tidbindung zwischen der Aminosäure fMet und dem Aminosäurerest der Aminoacyl-tRNA in der "a-site" des Ribosoms. Im Verlauf dieser Reaktion wird die Bindung zwischen Initiator-tRNA und fMet gelöst. Die "freie Energie" dieser Reaktion ermöglicht die Knüpfung der Peptidbindung. Mit der Bindung des Elongationsfaktors EF-G an das Ribosom und der Spaltung eines GTP-Moleküls wird die Translokationsreaktion ermöglicht, die eine relative Verschiebung des Ribosoms gegenüber der mRNA in 3'-Richtung der RNA bewirkt. Gleichzeitig wird die Peptidyl-tRNA von der a-site in die p-site des Ribosoms übertragen, und die Initiator-tRNA wird freigesetzt. In der a-site befindet sich ein neues Basentriplett, und nach Bindung eines codonspezifischen ternären Aminoacyl-tRNA·EF-Tu·GTP-Komplexes wiederholt sich der Elongationszyklus.
Sobald die Terminationscodons UAA, UAG oder UGA das Ende der Translation signalisieren, bewirken codonspezifische Terminationsfaktoren (RF 1, RF 2 und RF 3) den Abbruch der Synthese und die Freilassung der Polypeptidkette von der Peptidyl-tRNA (zusammenfassende Übersichten: Lengyel 1974; Pongs et al. 1974 und Wittmann 1976).

2. Die Struktur der Ribosomen

Die Masse der Ribosomen von E. coli ($2.65 \pm 0.2 \cdot 10^6$ Daltons, Hill et al. 1969) setzt sich zu zwei Dritteln aus RNA und zu einem Drittel aus Proteinen zusammen. Durch immunchemische Untersuchungen, chemische Modifizierungen und Proteasebehandlung der isolierten Untereinheiten wurde gezeigt, daß nahezu alle ribosomalen Proteine zumindest teilweise an der Oberfläche der Partikel liegen (Stöffler 1974 und Brimacombe et al. 1976 (Übersichtsartikel)).
Aus Bindungsversuchen mit RNA-spezifischen Farbstoffen (Cotter, McPhie & Gratzer 1967) und RNase-Behandlung intakter Untereinheiten (Santer 1963; Cox 1969) wurde geschlossen, daß die RNA nicht wie bei RNA-Viren im Innern der Partikel eingeschlossen vorliegt.
Die 30S Untereinheit enthält ein 16S RNA Molekül und 21 verschiedene Proteine (S1 - S21). Das Molekulargewicht der 16S RNA

beträgt nach Lichtstreuungsmessungen, Viskositätsbestimmungen und Sedimentationsstudien $0.56 \cdot 10^6$ Daltons (Kurland 1960), nach Endgruppenbestimmung $0.53 \cdot 10^6$ Daltons (Midgeley 1965), nach vorliegenden Sequenzergebnissen $0.55 \cdot 10^6$ Daltons (Ehresmann et al. 1972, 1975 a/b) und nach Sedimentationsgleichgewichtsmessungen $0.64 \cdot 10^6$ Daltons (Ortega & Hill 1973). Es ist bisher noch nicht geklärt, warum das von Ortega und Hill bestimmte Molekulargewicht der 16S RNA signifikant von den Ergebnissen anderer Autoren abweicht.

Die 50S Untereinheit setzt sich aus einem 23S, einem 5S RNA-Molekül und 34 Proteinen (L1 - L34) zusammen. Das Molekulargewicht der 23S RNA wurde von Kurland (1960) mit $1.1 \cdot 10^6$ Daltons, von Midgeley (1965) mit $1.00 \cdot 10^6$ und von Stanley und Bock (1965) mit $1.07 \cdot 10^6$ Daltons (Sedimentationsgleichgewichtsbestimmungen) angegeben. Das Molekulargewicht der 5S RNA beträgt aufgrund der Primärstrukturanalyse von Brownlee, Sanger und Barrell (1968) $5 \cdot 10^4$ Dalton.

Die Ribosomen unterscheiden sich in ihrer Struktur von Viren nicht nur in ihrem unterschiedlichen Aufbau und ihrem Massenverhältnis zwischen Protein und RNA sondern auch in der Vielzahl der unterschiedlichen Proteine. Waller & Harris (1961) und Waller (1964) zeigten mittels Elektrophorese in Stärkegelen, daß die Ribosomen mindestens 24 unterschiedliche Proteine enthalten. Nach Einführung der zwei-dimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kaltschmidt & Wittmann 1970 a,b) wurden insgesamt 55 rProteine aufgetrennt. Die Isolierung aller rProteine im präparativen Maßstab ermöglichte ihre Charakterisierung mit chemischen, physikalischen und immunologischen Methoden. Es wurde gezeigt, daß mit Ausnahme von L7 und L12 bzw. S20 und L26 keine ausgedehnten Homologien zwischen den ribosomalen Proteinen auftreten. Der einzige Unterschied zwischen L7 und L12 besteht in der Acetylgruppe am N-Terminus von L7. S20 und L26 sind sogar völlig identisch. Mit Ausnahme von S1 weisen alle rProteine Molekulargewichte zwischen 5400 und 32 000 Dalton auf. In ihrer Mehrheit sind sie stark basisch (die isoelektrischen Punkte von 70% der rProteine liegen bei pH 10 oder darüber). In isolierten rProteinen beträgt der α-Helixgehalt 20 - 40 % (Ausnahmen: L7/12: 50 - 60 %) (zusammenfassende Übersichten über chemische, physikalische und immuno-

logische Charakterisierungen der rProteine: Wittmann 1974; Wittmann & Wittmann-Liebold 1974; Stöffler 1974).
Die Aufklärung der Primärstruktur aller rProteine, die in nicht zu ferner Zukunft abgeschlossen sein wird, ist für das Studium der Protein-RNA- und Protein-Protein-Wechselwirkungen im Ribosom erforderlich.

3. Die Struktur der RNA unter besonderer Berücksichtigung der rRNA von E. coli

In der Proteinchemie wird zwischen Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine unterschieden.

Als Primärstruktur wird die Zahl und Sequenz der durch kovalente Bindungen miteinander verknüpften Aminosäuren definiert. Jegliche Organisation der flexiblen Polypeptidketten, die durch Wasserstoffbrücken zwischen den Carbonylsauerstoff- und den Amidstickstoffatomen zustande kommt, bezeichnet man als Sekundärstruktur. Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der Aminosäuren führen zur Tertiärstruktur. Die Zusammenlagerung mehrerer räumlich geordneter Peptidketten wird als Quartärstruktur bezeichnet.

Analog zu diesen Definitionen wird die Länge und Sequenz der RNA als ihre Primärstruktur bezeichnet.
5S RNA von E. coli (120 Nukleotide) war die erste ribosomale RNA, deren Sequenz vollständig aufgeklärt wurde (Brownlee, Sanger & Barrell 1968). In der Primärstruktur dieses Moleküls treten zwei Sequenzwiederholungen auf, die auf Genduplikationen zurückgeführt werden könnten. Die 5S RNA von E. coli weist nur geringe Heterogenität auf und enthält keine modifizierten Basen. Die 16S RNA (1520 Nukleotide) von E. coli, die von Ehresmann und Mitarbeitern (1972, 1975 a,b) weitgehend sequenziert worden ist, setzt sich aus 31.8 % Guanin, 23.3 % Cytosin, 24.8 % Adenin und 20 % Uracil zusammen. Sie enthält zehn methylierte Basen, die im 3'-terminalen Bereich des Moleküls gehäuft auftreten. Die Heterogenität der 16S RNA von E. coli ist gering, und sie betrifft nur 1 % aller Basen. Palindrome - unter diesem Begriff werden RNA Sequenzen verstanden, die vorwärts und rückwärts ge-

lesen die gleiche Nukleotidfolge ergeben - treten in der 16S RNA in den Sektionen C, R, I, I', K, C'2 und D auf.
Die Primärstruktur der 23S RNA wurde bisher erst in Teilbereichen bestimmt (Branlant et al. 1975).
Hinweise auf Sequenzhomologien zwischen 16S RNA und 23S RNA liegen bisher nicht vor.

Die Organisation der RNA-Kette in doppelhelikale Bereiche und vertikale Wechselwirkungen zwischen den π -Elektronensystemen benachbarter Basen in Einzelstrangregionen (single strand stacking) wird als Sekundärstruktur der RNA definiert (Cox & Kanagalingham 1966). Im Gegensatz zu den meisten DNA-Spezies formen ribosomale RNA und die meisten anderen natürlichen RNA-Spezies (Ausnahmen sind z.B. die doppelsträngigen RNA-Moleküle von Reovirus, Rice dwarf virus und die replikative Form von MS2) Wasserstoffbrücken zwischen Basen in Segmenten des gleichen Stranges. Diese intramolekularen Wechselwirkungen werden durch Rückfaltungen der RNA-Kette ermöglicht. Ribosomale RNA (von Pro- und Eukaryonten) kann als Ansammlung doppelhelikaler Bereiche angesehen werden, die 2N + b + c Basen enthalten. N ist die Zahl der Basenpaare in einem doppelsträngigen Segment, b die Anzahl der Basen in der Schleife (Haarnadelschleife), die den geschlossenen Teil des helikalen Bereichs darstellt, und c die Anzahl der ungepaarten Basen zwischen benachbarten doppelsträngigen Regionen (Cox & Kanagalingham 1966).
Mit verschiedenen physikalischen und chemischen Methoden (CD, IR, UV Denaturierungsspektren und chemische Modifizierungen mit Formaldehyd) wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt (McPhie & Gratzer 1966; Cotter & Gratzer 1969; Gould & Simpkins 1969; Cox 1969; Cox 1970), daß 60 - 70 % der ribosomalen RNA (von Pro- und Eukaryonten) doppelhelikal organisiert sind, und daß die Basen in den Einzelstrangregionen weitgehend durch Basenstapelungskräfte (vertikale Bindungskräfte) stabilisiert miteinander in Wechselwirkung stehen. Analysen von Denaturierungsspektren eukaryontischer rRNA (Kaninchen-Retikulocyten) ergaben, daß die helikalen Segmente N = 4-17 gepaarte Basen und insgesamt 25 $\pm$ 7 Basen enthalten (Cox 1966).

Versuche, die ribosomale RNA zu kristallisieren, gelangen nur, wenn die rRNA (aus E. coli, Hefe und Kaninchen-Retikulocyten)

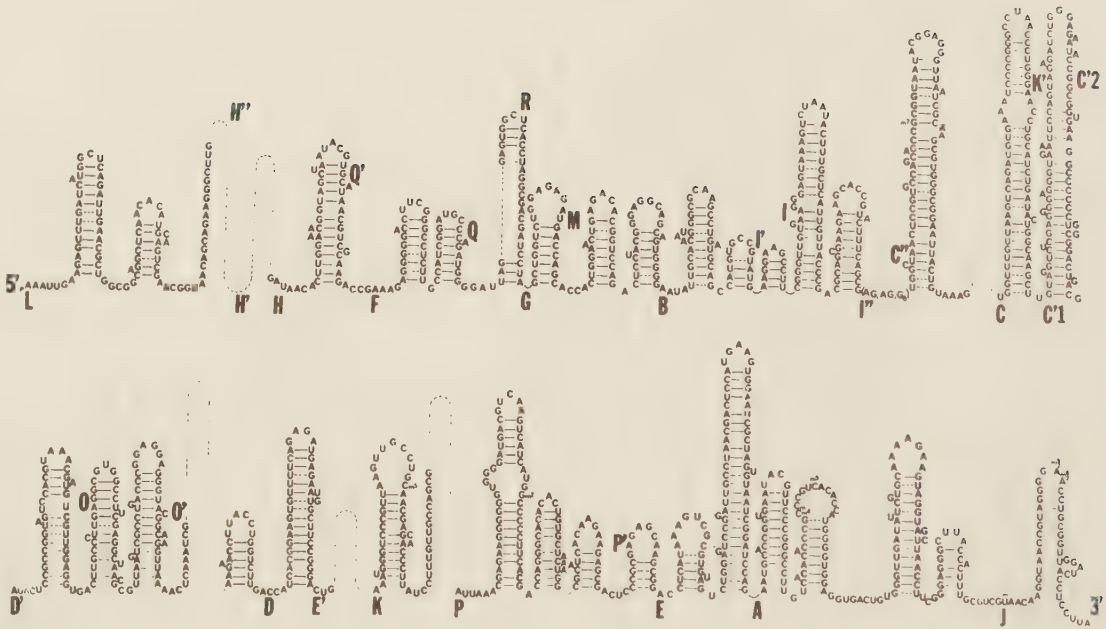


Abbildung 1

zuvor enzymatisch oder durch alkalische Hydrolyse zu kleinen Fragmenten zwischen 9000 und 20000 Dalton degradiert worden war (Spencer & Poole 1965; Spencer, Pigram & Littlechild 1969). Diese Fragmente entsprechen etwa dem Molekulargewicht der einzelnen helikalen Segmente, und der Helixgehalt der kristallisierbaren Fragmente ist identisch mit dem Helixgehalt intakter ribosomaler RNA (Cox 1966; Thomas & Spencer 1969). Durch Röntgenbeugungsuntersuchungen an diesen RNA-Kristallen konnte gezeigt werden, daß die Fragmente eine regelmäßige helikale Geometrie besitzen, die der A-Form kristallisierter DNA mit GC und AT Basenpaaren vom Watson-Crick-Typ sehr ähnlich ist. Im Kristall liegen die Fragmente Seite an Seite gepackt vor. Der Durchmesser der RNA Helix beträgt etwa 23 Å, die Höhe einer Identitätsperiode 28 - 30 Å und die Zahl der Basenpaare in den Fragmenten im Durchschnitt 10 - 12 Å (Arnott et al. 1966). Die Zahl der Basenpaare liegt innerhalb des Bereichs, den Cox (1966) aufgrund der Analyse von RNA-Denaturierungsspektren ermittelt hat.

Die größere Flexibilität der intakten rRNA gegenüber doppelsträngiger DNA in Lösung läßt sich durch die voneinander stark abweichenden Sekundärstrukturen erklären. Die Einzelstrangregionen zwischen den doppelhelikalen Segmenten der RNA sind frei um ihr Rückgrat drehbar, und sie können außerdem durch ihr Abknicken der RNA-Kette eine neue Richtung geben.

Unterschiede treten im Schmelzverhalten beider Makromoleküle auf. Im Vergleich mit doppelstängiger DNA sind die Schmelzkurven der rRNA breiter und durch niedrigere Tm-Werte gekennzeichnet.

Gould & Simpkins (1969) lösten Stufen in RNA-Schmelzkurven auf,

---

Abbildung 1: Nukleotidsequenz und hypothetische Sekundärstruktur der 16S RNA von E. coli (Ehresmann et al. 1972,1975ab)

Die gestrichelt eingezeichneten Linien kennzeichnen RNA-Bereiche, in denen die Reihenfolge der Oligonukleotide noch nicht aufgeklärt ist.

Das Sekundärstrukturmodell beruht auf den Ergebnissen von Hydrolysestudien und auf dem theoretischen Verfahren von Tinoco und Mitarbeitern (1971/1973).

Der 16S RNA Strang ist in 30 Sektionen unterteilt, die von Ehresmann und Mitarbeitern mit großen Buchstaben bezeichnet wurden.

die durch nicht kooperatives Ausschmelzen einzelner doppelhelikaler Bereiche unterschiedlicher Stabilität hervorgerufen werden.

Tinoco und Mitarbeiter (1971, 1973) entwickelten eine Methode, die es ermöglicht, für eine bekannte RNA-Primärstruktur die energetisch günstigste Sekundärstruktur zu berechnen. Die Ausbildung doppelhelikaler Segmente läßt sich nach diesen Autoren in zwei Schritte gliedern: die Bildung des ersten Basenpaares (Initiation) und die fortschreitende Knüpfung weiterer Basenpaare (Propagation). Die Differenz der totalen "freien Energie" (ΔG) zwischen einzelstängiger RNA und doppelhelikaler RNA ist gleich der Summe der Differenzen der "freien Energie" des Initiationsschrittes (ΔG_I) und der Differenz der "freien Energie" des Propagationsschrittes (ΔG_p).
Das Studium der Selbstassoziation von synthetischen Poly- und Oligonukleotiden bekannter Sequenz bei 25°C und in Lösungen hoher Ionenstärken führte zur Aufstellung folgender Stabilitätszahlen:

1.	A-U Paar:	+ 1	4.	Haarnadelschleife:	-5 bis -7
2.	G-C Paar:	+ 2	5.	Schleifen innerhalb der Helix:	-4 bis -7
3.	G·U Paar:	0	6.	Ausbuchtungen innerhalb der Helix:	-2 bis -7

Die unter den Punkten 4 bis 5 angegebenen Stabilitätszahlen hängen von der Anzahl der ungepaarten Basen in den Schleifen ab.
Die RNA-Struktur, die nach der Addition aller Stabilitätszahlen den größten positiven Wert aufweist, besitzt die niedrigste "freie Energie" und gilt daher als die wahrscheinlichste. In jüngster Zeit ist dieses Verfahren durch Einbeziehung der vertikalen Wechselwirkungen zwischen den Elektronenwolken benachbarter Basen verfeinert worden (Tinoco et al. 1973).
Die hypothetische Sekundärstruktur der 16S RNA von E. coli in der Abbildung 1 stützt sich auf die Ergebnisse der beschriebenen physikalischen Methoden, auf die Positionen der Schnitte einzelstrangspezifischer RNasen und auf die Anwendung des Verfahrens von Tinoco und Mitarbeitern.

Die für Proteine gebräuchliche Definition der Tertiärstruktur ist auf Nukleinsäuren wegen der ihnen fehlenden Seitenketten nicht übertragbar.
Eine Definition der Tertiärstruktur für RNA läßt sich aber aus der nahezu vollständig aufgeklärten Phenylalanin-tRNA Struktur ableiten.
Röntgenbeugungsbilder von tRNA-Kristallen (Hefe Phenylalanin-tRNA) zeigten neben den Basenpaaren der Kleeblattstruktur Basenpaare und -tripel, die nicht vom Watson-Crick-Typ sind, sowie zusätzlich auftretende vertikale Wechselwirkungen (stacking interactions). Diese "tertiären" Wechselwirkungen zwingen die tRNA in eine dem großen Buchstaben "T" ähnelnde Struktur (Kim et al. 1974; Robertus et al. 1974).

Seit längerer Zeit ist bekannt, daß bivalente Metall-Ionen die native Konformation der tRNA stabilisieren (Fresco et al.1966). Kürzlich wurde durch Gleichgewichtsdialysen gezeigt, daß $tRNA^{fMet_1}$ in 0.17 M Natriumchlorid nur einen spezifischen Bindungsort für Magnesiumionen enthält ($K = 3 \cdot 10^4\ mol^{-1}$) (Stein & Crothers 1976a,b).
Die Bindungsstelle für Mg^{2+} wurde von den gleichen Autoren in der Tertiärstruktur-Region der Dihydrouridin-Helix lokalisiert, die durch Magnesiumentzug völlig destabilisiert wurde. Thermische Denaturierung der tRNA führte zum Freisetzen des Ions. Wechselwirkungen zwischen der 2'OH Gruppe der Ribose und dem Phosphatsauerstoff, die zusätzlich zur Stabilisierung der Tertiärstruktur der tRNA beitragen, wurden kürzlich nachgewiesen (Ladner et al. 1976).

Zur Zeit existieren nur unklare Vorstellungen von der Natur tertiärer Wechselwirkungen innerhalb ribosomaler RNA. Unter Versuchsbedingungen, die die Sekundärstruktur der rRNA nicht beeinflussen, wurden kationspezifische Konformationsänderungen beschrieben, als deren Ursache Änderungen in der Tertiärstruktur der rRNA angesehen wurden (Cammack & Wade 1965; Nisbet & Slayter 1975; Morris, Dahlberg & Dahlberg 1974, 1975; Morrison & Garrett 1974).
Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die freie rRNA eine spezifische Tertiärstruktur besitzt, oder ob sie nur unter

geeigneten Ionenbedingungen eine unspezifische kompakte Struktur einnimmt.

Alle bisher aufgeführten strukturellen Eigenschaften der rRNA beruhen auf Ergebnissen von Experimenten mit deproteinisierter rRNA. Ribosomale RNA existiert in der Zelle jedoch zu keinem Zeitpunkt als intaktes proteinfreies Molekül. Es stellt sich nun die Frage, ob die rRNA in Lösung die gleiche Struktur besitzt wie im Ribosom. Von der RNA des TMV ist bekannt, daß sie im Virus einzelsträngig vorliegt, während sie als proteinfreies Molekül in Lösung eine ausgeprägte Sekundärstruktur aufweist (Franklin, Klug & Holmes 1957).
Hall & Doty (1959) zeigten mit Hilfe von UV-Denaturierungsspektren, daß die RNA im Ribosom doppelhelikale Strukturen ausbildet. Vergleichende Röntgenbeugungsuntersuchungen an nicht orientierten Ribosomen und isolierter RNA bestätigten die Ergebnisse von Hall & Doty (Zubay & Wilkins 1960; Klug, Holmes & Finch 1961). Vergleichende ORD-Messungen an Ribosomen und extrahierter rRNA von Hefe ergaben, daß 60 - 70 % der RNA im Ribosom und im freien Zustand basengepaart vorliegen (Cotter, McPhie & Gratzer 1967).
Ferner zeigte Cox (1969), daß die Reaktion der RNA im Ribosom mit Formaldehyd sehr ähnlich verläuft wie die Reaktion isolierter rRNA mit Formaldehyd.
Nach diesen Ergebnissen scheint zumindest der Betrag der Sekundärstruktur der freien rRNA der gleiche zu sein wie der der RNA im intakten Ribosom.

4. Lokalisation der Bindungsorte von primären ribosomalen Bindungsproteinen auf der 16S RNA

Nach der erfolgreichen Rekonstitution biologisch aktiver 30S Partikel aus 16S RNA und einem Gemisch aus 30S Proteinen durch Traub und Nomura (1968) wurden von mehreren Arbeitsgruppen die Proteine bestimmt, die einzeln mit der 16S RNA in spezifische Wechselwirkung treten können (Mizushima & Nomura 1970; Schaup, Green & Kurland 1970; Garrett et al. 1971; Zimmermann et al. 1972; Held et al. 1974).

Folgende rProteine aus der kleinen Untereinheit erfüllen die von den verschiedenen Arbeitsgruppen aufgestellten Kriterien für eine spezifische Wechselwirkung mit der 16S RNA: S4, S7, S8, S15, S17 und S20*).

In der hier vorliegenden Arbeit werden diese Proteine als primäre Bindungsproteine bezeichnet.

Die Lokalisation der Bindungsorte primärer Bindungsproteine auf der 16S RNA von E. coli ermöglichten folgende Methoden:

1. Rekonstitution eines primären Bindungsproteins Sx mit der 16S RNA zu einem spezifischen Sx-16S RNA Komplex. Die kontrollierte enzymatische Hydrolyse der nicht durch das Protein geschützten RNA durch spezifische RNasen führt zu Sx-RNA Fragmentkomplexen, die mittels Polyacrylamid-Gelelektrophoresen, Zentrifugation durch Sucrosegradienten oder durch Gelfiltration isoliert werden (Schaup et al. 1971; Zimmermann et al. 1972; Ungewickell et al. 1975).
   Nach Dissoziation des Proteins schließt sich die Bestimmung der Primärstruktur der RNA des spezifischen Fragmentkomplexes an. Die Spezifität des isolierten RNA Fragmentes wird durch Rekonstitution mit frischem Protein bewiesen.
   Mit dieser Methode wurden die Bindungsorte der Proteine S4, S7, S8, S15 und S20 auf der 16S RNA lokalisiert und charakterisiert (Schaup et al. 1971,1973; Zimmermann et al. 1972; Ungewickell et al. 1975).

2. Proteinfreie 16S RNA wird unter sehr milden Bedingungen mit spezifischen RNasen hydrolysiert, und die entstandenen RNA-Fragmente werden mittels Zentrifugation durch Sucrosegradienten voneinander getrennt. In Rekonstitutionsexperimenten mit einzelnen primären Bindungsproteinen wird herausgefunden, in welchen RNA-Fragmenten die Bindungsorte der getesteten Proteine lokalisiert sind. Die

---

*) Mit dem Colicin E3 RNA Fragment (40 Nukleotide vom 3'-Terminus der 16S RNA) tritt das Protein S1 in spezifische Wechselwirkung (Dahlberg & Dahlberg 1975).

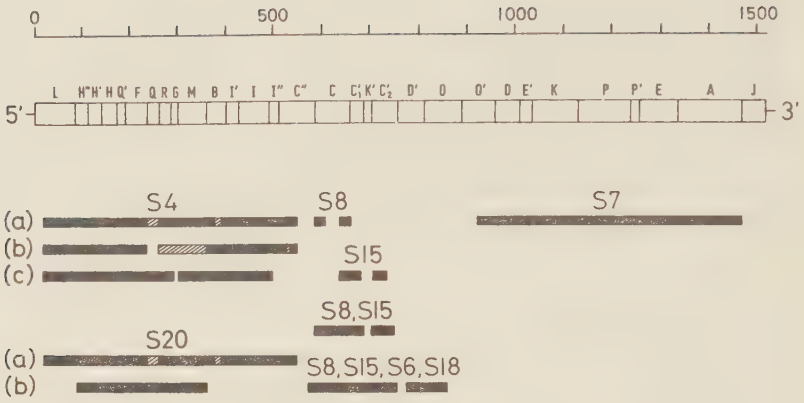


Abbildung 2: Die Bindungsorte der primären Bindungsproteine S4, S7, S8, S15 und S20 und der sekundären Bindungsproteine S6 und S18 auf der 16S RNA von *E. coli* (Zimmermann et al. 1975).

Die Skala über dem Blockdiagramm des 16S RNA Stranges gibt die Entfernung vom 5'-Terminus der 16S RNA in Nukleotiden an. Die mit unterschiedlichen Methoden isolierten spezifischen Proteinbindungsorte wurden schematisch unter dem Blockdiagramm der 16S RNA zusammengefaßt. RNA-Bereiche, die nur in geringen Ausbeuten in den Fragmenten nachzuweisen waren, wurden schraffiert eingezeichnet.

S4: a) 9S Fragment, das nach Hydrolyse von 16S RNA oder S4-16S RNA Komplexen mit RNase A isoliert wurde. Die proteinfreie 9S RNA läßt sich mit dem Protein S4 zu einem S4-9S Komplex rekonstituieren.

b) Geschütztes Fragment nach Hydrolyse von S4-16S RNA Komplexen mit RNase A.

c) Kontrollierte Hydrolyse der 16S RNA mit T_1-RNase führt zu einem 12S Fragment, mit dem die Proteine S4, S8, S15 und S20 in spezifische Wechselwirkung treten. Mit zwei Subfragmenten (s. Definitionen auf S.172) des 12S RNA-Fragmentes, die elektrophoretisch in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen isoliert wurden, tritt jedoch nur S4 in Wechselwirkung.

S20: a) 9S Fragment, das nach kontrollierter Hydrolyse von S20-S16-S17-16S RNA Komplexen mit RNase A isoliert wurde. S20 bindet in Gegenwart von S16 und S17 spezifisch an dieses Fragment. Analysen der 9S RNA mit Hilfe der Fingerprinttechnik ergaben, daß sie mit dem 9S Fragment, das das Protein S4 spezifisch bindet, identisch ist.

b) Geschütztes Fragment, das nach T_1-Hydrolyse von S20-16S RNA Komplexen isoliert wurde.

S8: Geschütztes Fragment, das nach RNase A-Hydrolyse von S8-16S RNA Komplexen isoliert wurde.

S15: Geschütztes Fragment, das nach RNase A-Hydrolyse von S15-16S RNA Komplexen isoliert wurde.

S8, S15:

Geschütztes 5S Fragment, das nach der Hydrolyse von S8-S15-16S RNA Komplexen mit RNase A isoliert wurde.

S8, S15, S6, S18:

Fragment, das nach der RNase A-Hydrolyse von S8-S15-S6-S18-16S RNA Komplexen isoliert wurde.

S7: Kontrollierte Hydrolyse von S7-16S RNA Komplexen mit T_1-RNase führt zu einem S7-8S RNA Komplex. Deproteinisierte 8S RNA konnte allerdings nicht mit S7 zu einem S7-8S RNA Komplex rekonstituiert werden.

Kontrollierte Hydrolyse von 30S Untereinheiten mit T_1-RNase führt zu einem RNP, das sich aus den Proteinen S7-S9-S10-S14-S19 zusammensetzt. Die Analyse der RNA dieses RNPs ergab, daß sie mit dem 8S RNA-Fragment nahezu identisch ist (Yuki & Brimacombe 1975).

Inkubation einzelner Fragmente mit einem Gemisch von 30S Proteinen ermöglicht auch Aussagen über die Bindungsbereiche sekundärer Bindungsproteine, die nur mit Hilfe der schon an die RNA gebundenen primären Bindungsproteine ihren Bindungsort erkennen können.
Die Primärstruktur der RNA-Fragmente wird durch Fingerprintanalysen und Vergleich der Oligonukleotidkarten mit denen der 16S RNA ermittelt.
Die Bindungsorte der primären Bindungsproteine S4, S4 - S20 und S8 - S15 wurden mit dieser Methode auf der 16S RNA lokalisiert (Zimmermann et al. 1972, 1974).

In der Abbildung 2 wurden die durch Anwendung beider Methoden erzielten Ergebnisse über die Bindungsorte primärer und einiger sekundärer Bindungsproteine auf der 16S RNA zusammengefaßt.

3. 30S ribosomale Untereinheiten werden kontrolliert mit spezifischen RNasen hydrolysiert, und die entstandenen Protein-RNA Fragmentkomplexe (RNPs) werden elektrophoretisch in Polyacrylamidgelen oder mittels Zentrifugation durch Sucrosegradienten isoliert. Anschließend wird die Proteinzusammensetzung der RNPs bestimmt und die mit den Proteinen assoziiert vorliegende RNA mit Hilfe der Fingerprinttechnik analysiert.
Mit dieser Methode, die als die nativste von den hier aufgezählten gilt, wurden die 16S RNA-Bereiche identifiziert, die mit den Proteinen S7-S9-S10-S14-S19 und S7-S19 assoziiert vorliegen (Yuki & Brimacombe 1975; Rinke, Yuki & Brimacombe 1976).

B. Hauptteil I

Native und denaturierte Formen der 16S RNA

1. Einführung

Die Bedingungen für optimale spezifische Wechselwirkungen zwischen primären Bindungsproteinen und der ribosomalen RNA sind anhand der Proteine S4, S8 und L24 systematisch untersucht worden (Schulte & Garrett 1972; Schulte, Morrison & Garrett 1974). Diese Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. 0.02 M Magnesium ist für die optimale Bindung aller drei Proteine an die RNA erforderlich.
2. 0.25 - 0.35 M KCl ist notwendig, um unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den überwiegend basischen Proteinen und der RNA zu unterdrücken.
3. Das pH-Optimum für die Wechselwirkung der drei Proteine mit der RNA liegt zwischen 7.4 und 8.0.
4. Optimale Bindung erfordert gemeinsame Inkubation aller Komponenten zwischen 35° und 42°C in TMK Puffer (mindestens 30 Minuten) und anschließende Abkühlung des Inkubationsgemischs auf Temperaturen unter 10°C, weil bei höheren Temperaturen die Protein-RNA Komplexe destabilisiert werden.
5. Temperaturen von 40°C und darüber beeinflussen sowohl die Struktur der RNA (Schulte, Morrison & Garrett 1974) als auch die der Bindungsproteine (Lemieux, Lefevre & Daune 1974).

Das Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es, anhand der Wechselwirkung zwischen S4 und der 16S RNA herauszufinden, in welcher Komponente durch die Inkubation bei 42°C eine bindungsfähige Konformation induziert wird.

2. Materialien

2.1	Acrylamid	Mitsubishi, Tokio, Japan
2.2	NN'-methylen-bis-acrylamid	Serva, Heidelberg
2.3	N,N,N',N'-tetramethylendiamin (TEMED)	Fluka, Buchs, Schweiz
2.4	Pyronin G	Merck, Darmstadt
2.5	Toluidin Blau	Merck
2.6	Coomassie Brilliant Blau	Serva
2.7	Bio-Gel, A-0.5 Agarose 100-200 mesh	Bio-Rad, Richmond, USA
2.8	Ribonuklease A (Enzygel)	Boehringer, Mannheim
2.9	Agarose	Boehringer
2.10	Sucrose (RNase-frei)	Schwarz/Mann, Orangeburg, USA

Alle weiteren Chemikalien, die zur Durchführung der Experimente benötigt wurden, entsprachen dem Reinheitsgrad "pro analysi".

2.11 Zusammensetzung häufig verwendeter Pufferlösungen:

2.11.1 Rekonstitutionspuffer nach Traub und Nomura (1968) (TMK-Puffer):
0.03 M Tris-HCl, pH 7.4
0.02 M $MgCl_2$
0.35 M KCl
0.006 M 2-Mercapto-Äthanol

2.11.2 Denaturierungspuffer (TEN-Puffer):
0.02 M Tris-HCl, pH 7.4
0.0025 M Äthylendiamintetraacetat (EDTA)
0.05 M NaCl

2.11.3 TM-Puffer
0.02 M Tris-HCl, pH 7.4
0.005 M $MgCl_2$

2.11.4 Elektrodenpuffer für Elektrophoresen:
0.02 M Tris-Acetat, pH 8.0
0.005 M Mg-Acetat

Alle Pufferlösungen, ausgenommen die Elektrodenpuffer, wurden im Autoklaven sterilisiert.

3. Methoden

3.1 Bakterienstamm

Die ribosomalen Proteine und die ribosomale RNA wurden aus *Escherichia coli* K12 (A19) (Gesteland 1966) isoliert.

3.2 Isolierung der 30S Untereinheiten

Die Bakterien wurden in reichem Medium gezogen und in der späten logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Nach Zerstörung der Zellwände mittels einer Bakterienpresse wurden die Ribosomen durch differentielle Zentrifugation aus den Zellen gewonnen und anschließend mit 0.5 M NH_4Cl gewaschen (Salas et al. 1965).

Die Dialyse der Ribosomenlösung gegen 0.01 M K_2HPO_4, 0.0001 M $MgCl_2$, 0.006 M 2-Mercaptoäthanol führte zur Dissoziation der Ribosomen in 30S und 50S Untereinheiten, die anschließend mittels Zentrifugation in einem Spinco B XV Zonalrotor voneinander getrennt wurden (Eickenberry et al. 1970).
Die 30S Untereinheiten wurden aus den gesammelten Gipfelfraktionen in einem Beckmann 60 Ti Rotor sedimentiert ($10^5 \cdot g \cdot 16$ Stunden) und als Niederschlag bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3.3 Isolierung der ribosomalen Proteine

30S Proteine wurden mit 67 % Essigsäure, die 0.37 M $MgCl_2$ enthielt, extrahiert (Hardy et al. 1969) und mittels Carboxymethylcellulose-Ionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration (Sephadex G 100) voneinander getrennt (Hindennach, Stöffler & Wittmann 1971).
Die gereinigten Proteine S4 und S20 wurden mir von Herrn Prof. Wittmann, Herrn Dr. Schiltz und Herrn Dr. Garrett zur Verfügung gestellt.
Mit Hilfe der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kaltschmidt & Wittmann 1970a) wurde die Reinheit der beiden Proteine überprüft.

3.4 Extraktion der ribosomalen RNA aus 30S Untereinheiten

3.4.1 Phenolextraktion:

6 - 8 mg 30S Untereinheiten wurden in 1 ml 0.1 M Na-Acetat, 0.001 M Mg-Acetat, 0.5 % Natriumlaurylsulfat, pH 5.0, (Extraktionspuffer) gelöst. Die Lösung wurde anschließend mit einem gleichen Volumen frisch destilliertem und mit Extraktionspuffer gesättigtem Phenol versetzt. Wenn das Gesamtvolumen der Probe 20 ml nicht überstieg, dann wurde die Extraktion durch Schütteln auf einem Vortex durchgeführt; ansonsten wurde ein Mixgerät (Waring/Blender) benutzt.
Die beiden Phasen wurden 15 Minuten lang bei Raumtemperatur miteinander vermischt und anschließend durch kurze niedertourige Zentrifugation (5000·g für 10 Minuten) wieder voneinander getrennt. Die wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde abpipettiert, und das Phenol wurde mit frischem Extraktionspuffer gewaschen.
Die gesammelten wässrigen Phasen wurden mindestens noch dreimal mit frischem Phenol geschüttelt, um an die RNA gebundene Proteine vollständig zu entfernen.

3.4.2 Ätherextraktion und Äthanolfällungen:

Um Phenolrückstände zu entfernen, wurde die wässrige Phase nach dem letzten Extraktionszyklus mit einem gleichen Volumen Diäthyläther versetzt und kurz auf einem Vortex geschüttelt. Mittels Zentrifugation (5000·g für 5 Minuten) wurden die Phasen wieder voneinander getrennt und der Diäthyläther abpipettiert.

Die RNA wurde über Nacht mit Äthanol (1 Volumen) ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (5000·g für 30 Minuten). Das Präzipitat wurde in 3-10 ml 0.2 M NaCl, 0.002 M EDTA, 0.001 M $MgCl_2$, pH 6.0, gelöst und anschließend mit 2 Volumina Äthanol bei -20°C gefällt und nach zwei Stunden abzentrifugiert. Danach wurde die RNA zunächst mit 80 %igem und dann mit absolutem Äthanol gewaschen.

3.4.3 Aufbewahrung der RNA:

Die 16S RNA wurde entweder als Präzipitat oder gelöst in TM

Puffer (0.02 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.005 M $MgCl_2$) bei -80°C eingefroren aufbewahrt.

3.4.4 Überprüfung der RNA-Qualität:

Die Qualität der isolierten RNA wurde durch die Elektrophorese eines Aliquots (13 µg) in 2.25 %igen Polyacrylamidgelen überprüft (Garrett et al. 1971).

3.5 Konzentrationsbestimmungen:

Die Proteinkonzentrationen wurden mit der Methode von Lowry und Mitarbeitern (1951) bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin. Das Ergebnis der Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Korrekturfaktor 0.84 multipliziert, um den Unterschied zwischen Rinderserumalbumin und ribosomalen Proteinen zu berücksichtigen.

Die Konzentration der RNA wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm (Extinktionskoeffizient $E^{1\%}_{1cm}$ (260) = 225) im Zeiss Spektrophotometer bestimmt.

3.6 Renaturierung und Denaturierung von 16S RNA

3.6.1 Renaturierung der RNA:

67 µg 16S RNA wurden in 20 µl TMK Puffer gelöst und bei unterschiedlichen Temperaturen zwischen 0°C und 60°C inkubiert. Die Inkubationszeiten betrugen bei Temperaturen bis 40°C eine Stunde. Bei höheren Temperaturen wurde die Inkubationszeit auf 5 Minuten begrenzt und anschließend 55 Minuten bei 40°C fortgesetzt. Die Einhaltung kurzer Inkubationszeiten bei hohen Temperaturen war notwendig, um unspezifische temperaturabhängige Hydrolysen der RNA, die durch Magnesiumionen katalysiert werden, zu reduzieren (Cammack, Miller & Grinstead 1970). Anschließend wurden die Proben langsam (30-60 Minuten) im Wasserbad auf 0°C abgekühlt.

3.6.2 Denaturierung der RNA:

Zu diesem Zweck wurde die RNA 5 Minuten lang in TMK Puffer auf

60°C erhitzt und anschließend schockartig in flüssigem Stickstoff abgekühlt.
In anderen Experimenten wurde die RNA über Nacht gegen TEN Puffer (0.02 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.0025 M EDTA, 0.05 M NaCl) dialysiert.

3.7 Bindungsexperimente mit S4

In der Regel wurde das Protein in einem fünffachen molaren Überschuß gegenüber der RNA in das Inkubationsgemisch pipettiert. Den stöchiometrischen Berechnungen wurde das Molekulargewicht $5.6 \cdot 10^6$ Dalton für die 16S RNA (Kurland 1960) und $2.255 \cdot 10^4$ Dalton für das Protein S4 (Reinbolt & Schiltz 1973) zugrunde gelegt.

3.7.1 Standardtestansatz:

444 µg 16S RNA wurden in 1 ml TMK-Puffer mit 70 µg S4 60 Minuten lang bei 40°C inkubiert und anschließend auf 0°C abgekühlt.

3.7.2 Abweichender Testansatz:

444 µg 16S RNA wurden in 1 ml TMK Puffer gelöst und bei unterschiedlichen Temperaturen vorinkubiert. Anschließend wurde die RNA mit 70 µg S4 60 Minuten bei 0°C inkubiert.

3.7.3 Entfernung nicht gebundener Proteine:

Proteine, die entweder nicht oder nur unspezifisch an die RNA gebunden hatten, wurden in TMK Puffer durch Gelfiltration von spezifischen Protein-RNA Komplexen und von freier 16S RNA abgetrennt. Zu diesem Zweck wurden (1 x 20 cm) A 0.5 Agarose-Säulen (100-200 mesh) benutzt.
Um die Komplexe nicht zu destabilisieren, wurden die Säulenläufe bei 4°C im Kältelabor durchgeführt. Die Absorption des Eluats bei 254 nm wurde durch ein LKB Uvicord-System aufgezeichnet. Die gesammelten S4-16S RNA Komplexe und freie 16S RNA wurden anschließend mit absolutem Äthanol (1.5-faches Volumen) bei -20°C gefällt und nach 48 Stunden abzentrifugiert (5000·g für 30 Minuten). Das Präzipitat wurde bis zur Analyse in kombinierten Agarose-Polyacrylamidgelen bei -20°C eingefroren aufbewahrt.

3.8 Agarose-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

(Peacock & Dingman 1968)

3.8.1 Präparation der kombinierten Agarose-Polyacrylamidgel-Platten:

Für 200 ml Gel wurden folgende Lösungen angesetzt:

1) 20 % Acrylamid und Vernetzer (19 g Acrylamid + 1 g Bis-acrylamid) in 100 ml Wasser

2) 0.16 g Ammoniumperoxidisulfat in 10 ml Wasser

3) 1 g Agarose in 100 ml Wasser. Die Agarose wurde unter starkem Rühren bei 100°C gelöst und anschließend auf 40°C abgekühlt.

30 ml Acrylamid-Stammlösung, 2 ml Tris-Acetat, pH 8.0, (1 molare Stammlösung), 0.5 ml Mg-Acetat (1 M) und 62.5 ml Wasser wurden bei Raumtemperatur entlüftet, anschließend auf 40°C erwärmt und mit 100 ml Agaroselösung (1 g) vermischt. Zu der Lösung wurden 5 ml Ammoniumperoxidisulfat und 0.2 ml TEMED pipettiert und anschließend sofort in die Elektrophoresekammer (Modell EC 470, E.C. Apparatus Co. Philadelphia, USA) gegossen. In die Kammer eingesetzte Kunststoffkämme formten Taschen für die Proben im Gel.

Durch ein Kühlschlangensystem in den Wänden der Elektrophoresekammer wurde die Acrylamidlösung auf Raumtemperatur abgekühlt. In der Regel war die Polymerisationsreaktion nach einer Stunde abgeschlossen. Nacheinander wurde dann überschüssiges Gel aus der Kammer entfernt, die Pufferbehälter mit Elektrophoresepuffer (0.02 M Tris-Acetat, pH 8.0, 0.005 M Mg-Acetat) gefüllt und die Kunststoffkämme vorsichtig aus dem Gel gezogen. Das Kühlschlangensystem der Kammer wurde an einen Kryostaten angeschlossen, der das Gel auf 1°C abkühlte.

3.8.2 Durchführung der Gelelektrophorese:

Nach einem einstündigen Vorlauf bei einer Spannung von 100 V wurden 67 µg 16S RNA oder S4-16S RNA Komplex in 30 µl TMK-Puffer, der 10 % Sucrose und 0.001 % Bromphenolblau enthielt, gelöst und mit einer Glaskapillare in die Geltaschen gefüllt.

Elektrophoresebedingungen: Spannung: 300 V
Stromstärke: 30 mA
Laufzeit: 9 Stunden

Der Elektrodenpuffer wurde während der Elektrophorese zwischen den Pufferreservoiren zirkuliert.

3.8.3 Spezifische Färbemethoden für RNA und Protein:

Um die RNA im Gel anzufärben, wurde die Gelplatte eine Stunde in ein Toluidinblau-Färbebad (0.1 % Toluidinblau in 5 %iger Essigsäure) gelegt und anschließend in 1 %iger Essigsäure entfärbt.
Protein wurde mit Coomassie Brilliant Blau im Gel spezifisch angefärbt. Zu diesem Zweck wurde die Gelplatte 30 Minuten in das Färbebad (0.1 % Coomassie Brilliant Blau in 7.5 %iger Essigsäure) gelegt und anschließend in 5 %iger Essigsäure entfärbt.
Die entfärbten Gele wurden photographiert und die Intensitäten der angefärbten RNA-Banden mit einem Joyce-Loebl-Mikrodensitometer aufgezeichnet.

3.9 Enzymatische Hydrolysen

3.9.1 Hydrolysebedingung:

444 µg unterschiedlich vorinkubierte 16S RNA (s. 3.6) oder 444 µg S4-16S RNA Komplexe wurden mit $8 \cdot 10^{-4}$ Einheiten trägergebundener RNase (Stammlösungen: 10 mg/ml TMK) in 70 µl TMK Puffer bei 20°C inkubiert. Die Inkubation wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Nach 5 Stunden wurde das Enzym in einer Mikrozentrifuge (Biodynamics) abzentrifugiert (8000·g für 5 Minuten). 67 µg des Hydrolysats wurden in 5%igen Polyacrylamid-Discgelen elektrophoretisch fraktioniert.

3.9.2 Durchführung der Polyacrylamid-Gelelektrophoresen zur Fraktionierung der Hydrolysate

100 ml 5%ige Acrylamidlösung (0.02 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.005 M $MgCl_2$) wurden bei Raumtemperatur entlüftet, und nach Zugabe von 0.32 ml Ammoniumperoxidisulfat (10%ige Stammlösung in H_2O) und 0.1 ml TEMED wurde die Lösung in 90 x 5 mm zylindrische Röhr-

chen gegossen, die an einem Ende mit Parafilm (American Can Company) verschlossen waren. Die Acrylamidlösung in den Röhrchen wurde vor der Polymerisationsreaktion mit Puffer überschichtet, um ihre Oberfläche zu begradigen. In der Regel war die Polymerisationsreaktion nach einer Stunde vollständig abgeschlossen.

Nach Entfernen des Parafilms wurden die Röhrchen in die Elektrophoresekammer eingesetzt und ein Vorlauf mit 150 V bei 4°C im Kältelabor durchgeführt.
Nach einer Stunde wurde ein Aliquot (30 µl) des Hydrolysats mit einer Glaskapillare auf das Gel aufgetragen, nachdem die Probe zuvor mit einer 50%igen Zuckerlösung vermischt worden war. Die Endkonzentration des Zuckers in der Probe betrug 10%.

Elektrophoresebedingungen:	Spannung:	150 V
	Stromstärke:	4 mA/Gel
	Laufzeit:	2 Stunden

Der Elektrodenpuffer wurde während der Elektrophorese zwischen den Pufferbehältern zirkuliert.

Die RNA in den Polyacrylamidgelen wurde mit Pyronin G über Nacht spezifisch angefärbt, und die Gele wurden anschließend in 5%iger Essigsäure entfärbt.
Die Pyronin G Färbelösung hatte folgende Zusammensetzung: 10 g Pyronin G, 20 g Lanthanacetat und 150 ml Eisessig in einem Liter Wasser.
Um Proteine spezifisch anzufärben, wurden die Polyacrylamidgele 5 Minuten lang in ein Coomassie-Brilliant-Blau-Färbebad gelegt und anschließend in 5%iger Essigsäure entfärbt.

3.10 Hyperchromizitätsmessungen:

Je 44 µg unterschiedlich vorinkubierte 16S RNA (s.Abschn.3.6) wurden in 2 ml 0.02 M Dimethylarsinsäure-Natriumsalz, 0.1 M KCl, 0.005 $MgCl_2$, pH 7.2, gelöst. Anschließend wurde die RNA-Lösung in sterile Quarzküvetten gefüllt und in einem Exsikkator, der an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, bei Raumtemperatur entlüftet.
Die Absorption der RNA bei 258, 282 und 320 nm wurde in Abhängig-

keit von der Temperatur in einem Cary-Spektrophotometer (Modell 16) gemessen. Die Küvetten, die mit Teflonstopfen verschlossen waren, wurden in einem heizbaren Küvettenhalter, der mit einem Wasserbad (Haacke) verbunden war, erwärmt.
Die Temperatur der RNA-Lösung wurde direkt durch ein elektronisches Thermometer gemessen, dessen Meßdiode außerhalb des Lichtweges in die Lösung tauchte. Das Thermometer wurde mir von Herrn Dr. Maschler für diese Experimente zur Verfügung gestellt.
Die temperaturabhängige Expansion des Wassers wurde bei der Auswertung der Meßergebnisse berücksichtigt.
Durch Bestimmung der Absorption bei 320 nm konnten Absorptionsänderungen, die durch Präzipitation der RNA oder durch Luftblasen hervorgerufen wurden, berücksichtigt werden.

In einem weiteren Experiment wurde die Änderung der Absorption im Verlauf der Renaturierungsreaktion der RNA im Spektralphotometer verfolgt. Zu diesem Zweck wurden 44 µg 16S RNA, die zuvor mittels Dialyse gegen TEN Puffer (0.02 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.0025 M EDTA, 0.05 M NaCl) denaturiert worden war, in 2 ml TMK Puffer gelöst und innerhalb von 5 Minuten von 17.5°C auf 42°C im Spektralphotometer erwärmt. Nach einstündiger Inkubation bei 42°C wurde die RNA-Lösung innerhalb von 15 Minuten wieder auf 17.5°C abgekühlt. Die Absorption der RNA wurde in Intervallen von 10 Minuten bestimmt.

3.11 Fluoreszenzmessungen

Je 18 µg unterschiedlich vorinkubierte 16S RNA (s.Abschn.3.6) wurden in 2 ml TM oder TEN Puffer gelöst. Schrittweise wurde zu den Proben und zu einer Referenz, die nur das Lösungsmittel enthielt, 0.56 µg Ethidium Bromid (Eth.Br.) pipettiert.
In einem von Dr. Le Pecq entwickelten Fluorometer wurde der Farbstoff mit Licht der Wellenlänge 540 nm angeregt, und die Intensität der Fluoreszenz des Eth.Br. wurde bei 610 nm von einer Photozelle gemessen. Die Intensität der Fluoreszenz erhöht sich um den Faktor 30, wenn der Farbstoff in doppelhelikale Bereiche der RNA interkaliert. Die Titration der RNA mit dem

Farbstoff wurde beendet, wenn die Fluoreszenz in der Probe nach Zugabe des Eth.Br. um den gleichen Wert anstieg wie in der Referenz, weil dann der Sättigungspunkt der RNA erreicht war.
Die Affinitätskonstante für die Wechselwirkung des Farbstoffs mit der RNA und die Zahl der Bindungsorte wurden mit Hilfe der Scatchard Gleichung bestimmt (Scatchard 1949):

$$\frac{r}{c} = K (n - r)$$

r = Konzentration des an der RNA gebundenen Farbstoffs
n = Zahl der Bindungsorte/$Phosphat_{RNA}$
c = Konzentration des freien Farbstoffs
K = Affinitätskonstante

Die Gleichung gilt in dieser Form für voneinander unabhängige Bindungsorte.
Die graphische Darstellung r/c als Funktion von r wurde von einem Hewlett-Packard (Modell 10) Rechner nach Eingabe der Meßwerte ausgedruckt. Der Anstieg der Geraden entspricht der Affinitätskonstante -K und der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse der Anzahl der Bindungsorte n pro $Phosphat_{RNA}$.

3.12 Sedimentationsstudien

Die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge (Spinco Modell E) durchgeführt.
36 µg unterschiedlich in 1 ml TMK-Puffer vorinkubierte 16S RNA wurden in Kel-F Doppelsektor UZ-Zellen eingefüllt. Für den Lauf wurde ein An-G Ti Rotor mit fünf Plätzen für UZ-Zellen benutzt. Mit Hilfe einer UV-Absorptionsoptik, die mit einem Multiplexer, einem photoelektrischen Scanner und einem zehn Zoll Schreiber gekoppelt war, wurde die Sedimentation der RNA verfolgt. Die Rotorgeschwindigkeit betrug 40 000 UpM, die Temperatur 23°C und der Aufnahmezeitabstand 16 Minuten.

4. Resultate

4.1 Konformationen der 16S RNA

Denaturierte 16S RNA wurde in verschiedenen Ansätzen bei 0°, 40° und $60^{o}C$ in TMK Puffer inkubiert und anschließend elektrophoretisch in kombinierten Agarose-Polyacrylamidgel-Platten, die neben 0.02 M Tris-Acetat, pH 8.0, 0.005 M Mg-Acetat enthielten, fraktioniert.
Bei $0^{o}C$ inkubierte monomere 16S RNA wanderte in zwei Banden, die mit D und N_1 bezeichnet wurden (Abbildung 3, Tasche a). In der Bande D, deren RNA die geringere elektrophoretische Mobilität aufwies und auch sehr heterogen erschien, befanden sich etwa 80 % der monomeren 16S RNA, während der Rest der RNA in der sehr homogen erscheinenden Bande N_1 wanderte.
Nach Inkubation der 16S RNA bei $40^{o}C$ erschien unter der Bande D eine Bande (N_2), die eine noch etwas größere Mobilität aufwies als die Bande N_1 (Abbildung 3, Tasche c). Das Intensitätsverhältnis zwischen D und N_2 betrug etwa 1:1. Die Bande N_1 war nicht mehr eindeutig nachzuweisen.
Nach Inkubation der RNA bei $60^{o}C$ in TMK Puffer befanden sich 72 % der monomeren 16S RNA Moleküle in der Bande N_2 (Abbildung 3, Tasche b).
In der Tasche d wurde 16S RNA aufgetragen, die nach Inkubation bei $60^{o}C$ schockartig in flüssigem Stickstoff abgekühlt worden war. Die monomere 16S RNA wanderte nach dieser Behandlung wieder in den Banden D und N_1.

Mit diesem Kontrollexperiment konnte gezeigt werden, daß sich die RNA-Moleküle, die in den Banden D, N_1 und N_2 wanderten, nicht in ihren Molekulargewichten voneinander unterschieden, sondern in unterschiedlichen Konformationen vorliegen müssen. Wenn die Elektrophorese in Abwesenheit von Magnesium durchgeführt wurde, dann wanderte die 16S RNA immer in einer breiten diffusen Bande (s. Abbildung 4).

4.2 Bindungsexperimente mit dem Protein S4

Um zu prüfen, welche der drei in kombinierten Agarose-Polyacrylamidgel-Platten aufgelösten 16S RNA-Konformationen mit dem Pro-

Abbildung 3: Elektrophoretische Auftrennung verschiedener 16S RNA-Konformationen in kombinierten Polyacrylamid(3%)-Agarose-Gelen (0.5%).

67 µg denaturierte 16S RNA wurde in 20 µl TMK-Puffer bei unterschiedlichen Temperaturen vorinkubiert und anschließend bei 1°C elektrophoretisch in kombinierten Polyacrylamid-Agarose-Gelen fraktioniert (s. "Methoden": 3.8). Der Elektrodenpuffer enthielt 0.02 M Tris-Acetat, pH 8.0, und 0.005 M Mg-Acetat. Die RNA wurde mit Toluidin-Blau angefärbt.

a) Vorinkubation bei 0°C
b) Vorinkubation bei 60°C und langsame Abkühlung auf 0°C
c) Vorinkubation bei 40°C und langsame Abkühlung auf 0°C
d) Vorinkubation bei 60°C und schockartige Abkühlung in flüssigem Stickstoff

Abbildung 4: Elektrophoretische Fraktionierung von 16S RNA in Abwesenheit von Magnesium im Elektrodenpuffer.

Die 16S RNA wurde bei 60°C in TMK-Puffer vorinkubiert und anschließend in kombinierten Polyacrylamid-Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (s. Legende zur Abbildung 3). Der Elektrodenpuffer enthielt 0.02 M Tris-Acetat, pH 8.0, und 0.05 M NH_4Cl.

Abbildung 5: Elektrophoretische Auftrennung von verschiedenen 16S RNA-Konformationen und S4-16S Komplexen in kombinierten Polyacrylamid-Agarose-Gelen.

Die 16S RNA wurde bei 0° oder 60°C in TMK-Puffer vorinkubiert und anschließend mit dem Protein S4 bei 0°C inkubiert (s."Methoden": 3.7.2). Die Elektrophoresebedingungen sind aus der Legende zur Abbildung 3 zu entnehmen. Die RNA wurde mit Toluidin-Blau und das Protein mit Coomassie Brilliant Blau spezifisch gefärbt.

a) 16S RNA bei 0°C vorinkubiert (Konformationen D und N_1)
b) 16S RNA bei 60°C vorinkubiert (Konformation N_2)
c) 16S RNA bei 0°C vorinkubiert, anschließende Inkubation mit S4
   1) RNA spezifische Färbung, 2) proteinspezif.Färbung
d) 16S RNA bei 60°C vorinkubiert, anschließende Inkubation mit S4
   1) RNA spezifische Färbung, 2) proteinspezif.Färbung

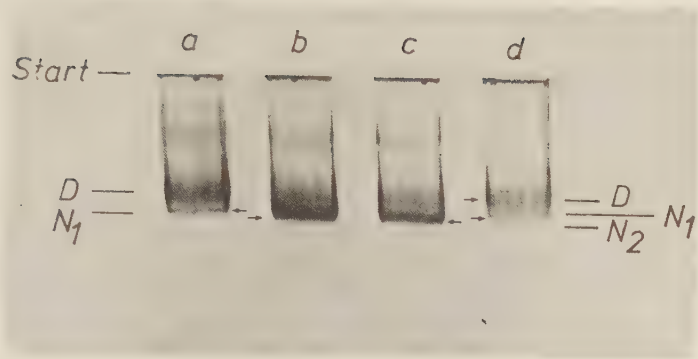


Abbildung 3:

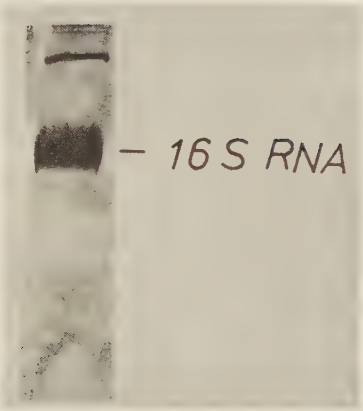


Abbildung 4:

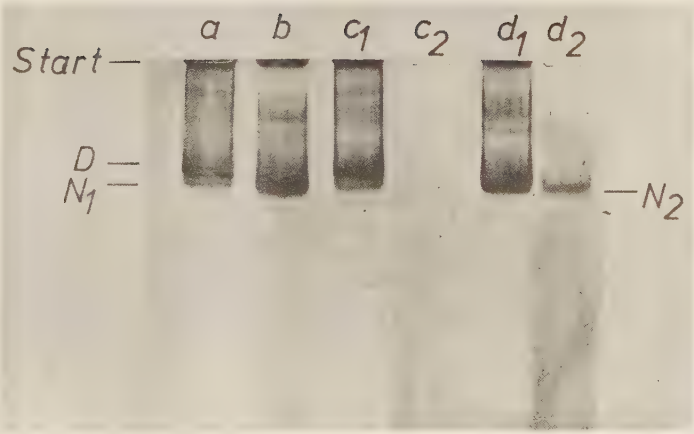


Abbildung 5:

tein S4 in Wechselwirkung treten kann, wurde denaturierte 16S RNA in verschiedenen Ansätzen bei 0°C und bei 60°C in TMK-Puffer vorinkubiert und anschließend eine Stunde lang mit einem fünffachen molaren Überschuß an S4 bei 0°C in TMK-Puffer inkubiert. In einem Kontrollexperiment wurde das Protein S4 unter Standardbedingungen zusammen mit der RNA bei 40°C in TMK inkubiert. Nach Abtrennung des ungebundenen Proteins wurden die Komplexe und freie 16S RNA in Duplikaten in kombinierten Agarose-Polyacrylamidgel-Platten fraktioniert.

Die Gelplatte in Abbildung 5 zeigt, daß sich nur die RNA-Bande N_2 stark mit dem proteinspezifischen Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau anfärben ließ. An der N_1 RNA konnte kaum Protein und an der RNA-Bande D kein Protein nachgewiesen werden.

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, daß das Verhältnis zwischen den RNA-Konformationen D und $N_{1/2}$ nur eine Funktion der Inkubationstemperatur war und nicht durch das Protein S4 zugunsten von $N_{1/2}$ geändert werden konnte.

Tabelle I: Das Verhältnis der 16S RNA Konformation D zu $N_{1/2}$ den. 16S RNA zwischen 0° und 60°C in Gegenwart und Abwesenheit von S4

	Inkubationstemperatur		
	0°C	40°C	60°C
ohne S4	3.8	0.9	0.3
mit S4	4.0	0.9*)	0.26

*) In diesem Falle wurden S4 und 16S RNA gemeinsam bei 40°C inkubiert

Der Fehler bei der Bestimmung der Intensitäten der RNA-Banden betrug ± 20 %.

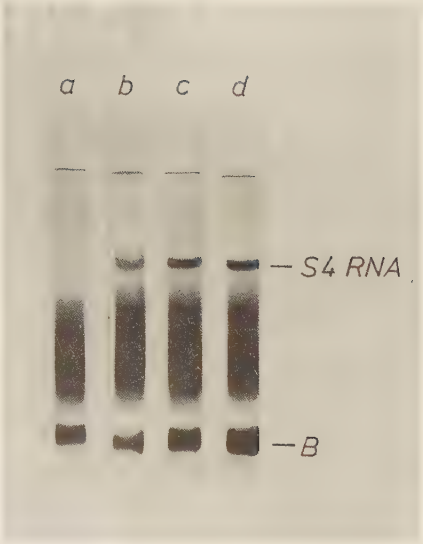


Abbildung 6:

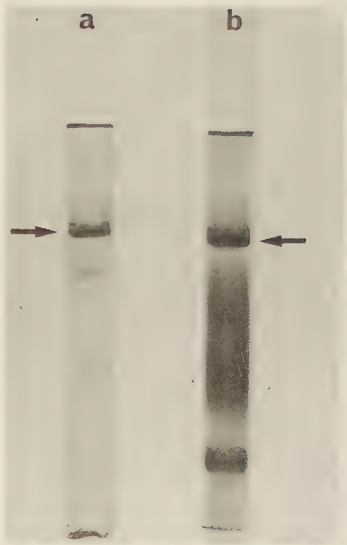


Abbildung 7:

4.3 Hydrolyseuntersuchungen mit trägergebundener RNase A

16S RNA, die in verschiedenen Ansätzen bei 0°, 20°, 40° und 60°C in TMK-Puffer vorinkubiert worden war, wurde unter milden Bedingungen mit trägergebundener pankreatischer RNase verdaut. Die Hydrolysate wurden anschließend in 5%igen Polyacrylamid-Gelen fraktioniert. Aus der Abbildung 6 ist zu ersehen, daß sich mit ansteigender Vorinkubationstemperatur die RNase-Resistenz der 16S RNA erhöhte. Die Resistenz drückte sich in hohen Ausbeuten eines relativ großen RNA Fragments (R_F: 0.34) aus.
Die direkte Beziehung zwischen der 16S RNA Konformation $N_{1/2}$ und dem resistenten RNA-Fragment konnte auch durch die kontrollierte Hydrolyse spezifischer S4-16S RNA-Komplexe mit trägergebundener RNase A nachgewiesen werden.
Das Polyacrylamid-Gel a in Abbildung 7 wurde mit dem proteinspezifischen Farbstoff Coomassie Brilliant Blau gefärbt und das Gel b mit dem RNA spezifischen Farbstoff Pyronin G. Ein Vergleich beider Gele zeigte, daß das Protein S4 vorwiegend mit dem relativ großen RNA-Fragment assoziiert war.
Sequenzanalysen ergaben, daß beide Fragmente mit dem Bindungsort von S4 auf der 16S RNA identisch waren (s. Teil II).

Abbildung 6: Hydrolysate von unterschiedlich vorinkubierter 16S RNA.

16S RNA wurde in verschiedenen Ansätzen bei 0°, 20°, 40° u.60°C in TMK-Puffer vorinkubiert und anschließend mit RNase A hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden in 5%igen Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch fraktioniert. (Vgl. "Methoden": 3.9.2)

a) Vorinkubation bei 0°C
b) Vorinkubation bei 20°C
c) Vorinkubation bei 40°C
d) Vorinkubation bei 60°C

Die RNA wurde mit Pyronin G spezifisch angefärbt
B: Bromphenolblau

Abbildung 7: Hydrolysat von spezifischen S4-16S RNA-Komplexen.

S4-16S RNA-Komplexe wurden mit RNase A hydrolysiert und in 5%igen Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch fraktioniert (s. "Methoden": 3.9.2).

a) proteinspezifische Färbung
b) RNA-spezifische Färbung

4.4 Zugänglichkeit der doppelhelikalen RNA-Bereiche verschiedener 16S RNA Konformationen für den Farbstoff Ethidium Bromid

16S RNA, die bei 0°C und 60°C in TMK-Puffer inkubiert worden war, sowie S4-16S RNA Komplexe und 16S RNA in TEN-Puffer wur-

Abbildung 8: Graphische Darstellung nach Scatchard (1949) von der Eth.Br. Bindung an unterschiedliche 16S RNA Konformationen.

r: Konzentration des gebundenen Farbstoffs/Nukleotid
c: Konzentration des freien Farbstoffs
a) 16S RNA nach Vorinkubation bei 60°C in TMK-Puffer (Konformation N_2) - - - - - - -
b) 16S RNA nach Vorinkubation bei 0°C in TMK-Puffer (Konformation D und N_1) -·-·-·-
c) 16S RNA in TEN-Puffer (partiell denaturiert) ———

den mit dem Farbstoff Ethidium Bromid titriert. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs ist der Zahl seiner Bindungsorte auf der RNA proportional. Aus der graphischen Darstellung nach Scatchard (1949) wurde sie für die verschiedenen 16S RNA Konformationen ermittelt (s. Abbildung 8).
16S RNA in TEN-Puffer enthielt 160, bei 0°C in TMK-Puffer vorinkubierte 16S RNA (vorwiegend Konformation D) 77 und bei 60°C in TMK-Puffer vorinkubierte 16S RNA (vorwiegend Konformation $N_{1/2}$) 54 Bindungsorte für Ethidium Bromid.
Die Zahl der Ethidium-Bromid Bindungsorte für S4-16S RNA Komplexe wich nicht signifikant von der für renaturierte 16S RNA (Konformation $N_{1/2}$) ab.

4.5 Der Verlauf der thermischen Denaturierung verschiedener 16S RNA Konformationen

Das Schmelzverhalten der 16S RNA Konformationen D und $N_{1/2}$ wurde in 0.005 M $MgCl_2$, 0.01 M Dimethylarsinsäure Natriumderivat und 0.1 M KCl, pH 7.2, durch Messung der Hyperchromizität in einem Cary 16 Spektrophotometer charakterisiert. Abbildung 9a zeigt die Schmelzkurve der 16S RNA in den Konformationen $N_{1/2}$, die einen Tm-Wert von 69°C aufweist.
Die Schmelzkurve der 16S RNA, die in der Konformation D vorliegt, weicht von der renaturierten 16S RNA nicht signifikant ab.

In einem zweiten Experiment wurde die Absorptionsänderung der 16S RNA während der Renaturierungsreaktion verfolgt. Zu diesem Zweck wurde die 16S RNA im Spektrophotometer von 17.5°C auf 42°C erwärmt und nach 55 Minuten langsam wieder auf 17.5°C abgekühlt. Auch in diesem Experiment konnte keine signifikante Veränderung in der Absorption der 16S RNA beobachtet werden (Abbildung 9b).

4.6 Sedimentationsuntersuchungen

Durch Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe konnten die beiden 16S RNA Konformationen D und $N_{1/2}$ nicht voneinander unterschieden werden.

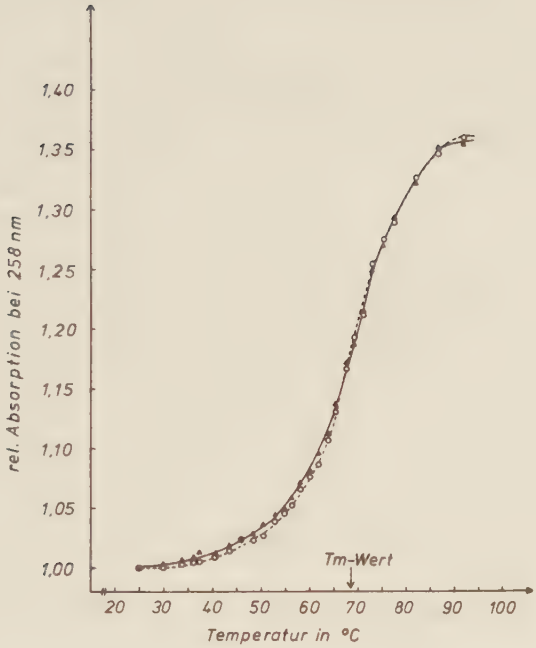


Abbildung 9a: Schmelzkurven von unterschiedlich vorinkubierter 16S RNA.

In TMK-Puffer unterschiedlich vorinkubierte 16S RNA wurde in 0.01 M Cacodylat, 0.1 M KCl und 0.005 M $MgCl_2$ aufgenommen. Die Absorption der RNA wurde in Abhängigkeit von der Temperatur in einem Cary 16 Spektrophotometer gemessen (s. "Methoden": 3.10).

Bei 0°C vorinkubierte 16S RNA ———
Bei 60°C vorinkubierte 16S RNA - - - - - - -

$$\text{relative Absorption} = \frac{\text{Absorption bei } T}{\text{Absorption bei } T_{25}} \qquad 25^{\circ}C \leq T \leq 90^{\circ}C$$

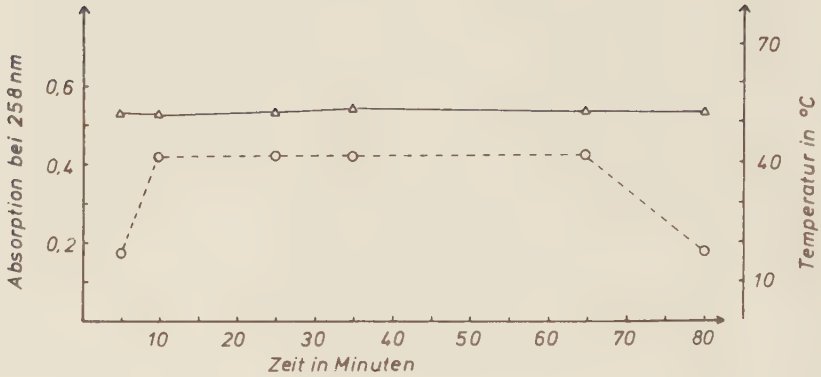


Abbildung 9b: Absorptionsänderung der denaturierten 16S RNA während der Vorinkubation in TMK-Puffer

Absorption der 16S RNA ———

Temperatur ------

5. Diskussion

5.1 Die Bedeutung der 16S RNA Konformationen für die spezifische Wechselwirkung der RNA mit dem Protein S4

In kombinierten Agarose-Polyacrylamid-Gelen konnte monomere 16S RNA elektrophoretisch in mehrere Banden aufgelöst werden, wenn die Elektrophorese bei Temperaturen zwischen 0°C und 2°C durchgeführt wurde und der Elektrodenpuffer 0.005 M Magnesiumionen enthielt.
Da sich alle RNA Banden reversibel ineinander überführen ließen, ist anzunehmen, daß die Mobilitätsunterschiede nicht auf Degradierungen in der RNA beruhen, sondern auf unterschiedliche Konformationen der 16S RNA zurückzuführen sind.
16S RNA, die bei 0°C in TMK-Puffer inkubiert wurde, lag in zwei Konformationen vor (D und N_1). Nach Inkubation der RNA zwischen 40°C und 60°C in TMK-Puffer konnte im Polyacrylamid-Gel eine neue Bande (N_2) nachgewiesen werden, die mit ansteigender Vorinkubationstemperatur intensiver wurde. Die elektrophoretische Mobilität der RNA in der Konformation N_2 war geringfügig größer als die der N_1-RNA.

Kationspezifische Konformationsänderungen in der 16S RNA wurden von Morris, Dahlberg & Dahlberg (1974, 1975) beschrieben. Die Autoren trennten die unterschiedlichen 16S RNA Konformationen auch in kombinierten Agarose-Polyacrylamid-Gelen bei niedrigen Temperaturen auf, benutzten aber einen Elektrodenpuffer, der neben Tris-Borat nur noch 0.0025 M EDTA enthielt. Dieser Puffer wurde für geeignet befunden, kationspezifische Konformationsänderungen der RNA während der Elektrophorese zu fixieren. Wegen dieser unterschiedlicnen Elektrophoresebedingungen können die von Morris und Mitarbeitern beschriebenen verschiedenen 16S RNA Konformationen nicht direkt mit denen verglichen werden, die in der hier vorliegenden Arbeit aufgelöst wurden. Nur folgende Beobachtung der oben genannten Autoren ist mit den hier vorliegenden Ergebnissen vergleichbar:
Wenn an die RNA gebundenes Magnesium gegen monovalente oder große bivalente Ionen (kristalliner Ionenradius > 1 Å) ausgetauscht wurde, dann verringerte sich die elektrophoretische

Mobilität der 16S RNA im Polyacrylamidgel.
Zugabe von Magnesium führte erst dann wieder zur kompakten 16S RNA Konformation, wenn die RNA in Gegenwart von Magnesium auf mindestens 40°C erhitzt worden war.

Um zu prüfen, ob die durch Inkubation zwischen 40°C und 60°C in TMK-Puffer induzierten Konformationsänderungen der 16S RNA für die spezifische Wechselwirkung der RNA mit dem Protein S4 notwendig sind, wurde in TMK-Puffer unterschiedlich vorinkubierte 16S RNA mit S4 bei 0°C inkubiert.
Es konnte eindeutig gezeigt werden, daß das Protein S4 nur mit den 16S RNA Konformationen $N_{1/2}$ in spezifische Wechselwirkung treten konnte. Das Protein S4 beeinflußte auch nicht die Überführung der Konformation D in die bindungsfähigen Konformationen $N_{1/2}$.
Die 16S RNA Konformation N_1 stellt möglicherweise eine Zwischenstufe partiell renaturierter RNA dar.
Weitergehende Bindungsexperimente mit anderen primären Bindungsproteinen werden zur Zeit durchgeführt. Vorläufige Resultate deuten darauf hin, daß das Protein S15 mit allen Konformationen (D, N_1 und N_2) in spezifische Wechselwirkung treten kann.
Die Ursache für das von S4 abweichende Bindungsverhalten könnte in dem weniger komplizierten und stabileren Bindungsort dieses Proteins auf der 16S RNA (Ungewickell et al. 1975) liegen.

Lemieux, Lefevre & Daune (1974) untersuchten unter Rekonstitutionsbedingungen den Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Konformationen der Proteine S3, S4, S6, S7 und S8 sowie auf die Konformation der 16S RNA.
In den Proteinen S3, S4 und S7 wurden von ihnen bei 42°C mit einer optischen Methode (Zirkulardichroismus) reversible Konformationsänderungen beobachtet. In der RNA dagegen konnten sie unter gleichen Versuchsbedingungen weder mittels Zirkulardichroismus noch durch UV-Absorptionsspektren Konformationsänderungen nachweisen.
Aus ihren Ergebnissen schlossen die Autoren, daß die Inkubation bei 42°C notwendig sei, um primär in den Proteinen eine bindungsfähige Konformation zu induzieren.
Aufgrund der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit scheinen

zumindest für die Bindung von S4 an die 16S RNA keine temperaturabhängigen Konformationsänderungen des Proteins für die Bindung erforderlich zu sein.

5.2 Zugänglichkeit einzelstringiger und doppelhelikaler RNA-Bereiche in denaturierter und renaturierter 16S RNA

Konformationsuntersuchungen an Nukleinsäuren können mit basenspezifischen Ribonukleasen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde bei unterschiedlichen Temperaturen in TMK-Puffer vorinkubierte 16S RNA unter milden Bedingungen mit trägergebundener RNase A hydrolysiert. RNase A zerschneidet die RNA spezifisch hinter den Basen Cytosin und Uracil, wenn diese in einzelstängigen Segmenten auftreten.
Die Polyacrylamid-Gele in der Abbildung 6 zeigen, daß die 16S RNA mit ansteigender Vorinkubationstemperatur RNase-resistenter wurde. Die Resistenz drückte sich in höheren Ausbeuten eines großen RNA-Fragmentes aus, das den Bindungsort von S4 enthält (s. Teil II).
Dieses Ergebnis zeigte, daß der Bindungsbereich von S4 auf der 16S RNA nur in seiner RNase-resistenten Konformation von dem Protein S4 erkannt werden kann.

Die Reproduzierbarkeit der Darstellung dieses Fragmentes ermöglichte, indirekt die Aktivierungsenergie für den Übergang von der 16S RNA Konformation D zur Konformation $N_{1/2}$ zu berechnen.
Der ermittelte Zahlenwert für diese Aktivierungsenergie betrug $E_a = 39\ 500 \pm 3000$ cal mol^{-1}. Er ist fast identisch mit der Aktivierungsenergie für die Rekonstitution intakter 30S Untereinheiten aus 16S RNA und einem Gemisch von 30S Proteinen (37 800 cal mol^{-1}) (Traub & Nomura 1969).
Nach diesen übereinstimmenden Werten kann man schließen, daß die Aktivierungsenergie für die totale Rekonstitution der 30S Untereinheit vorwiegend für Konformationsänderungen der RNA benötigt wird.

Durch Bindung des Farbstoffs Ethidium Bromid an unterschiedliche 16S RNA Konformationen sollte die Zugänglichkeit der doppel-

helikalen RNA-Bereiche untersucht werden. Ethidium Bromid interkaliert zwischen zwei übereinandergestapelten Basenpaaren, wobei die Bindung durch Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Stickstoff im Phenanthridin-Ringsystem und den negativ geladenen Phosphatresten der RNA und durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den π-Elektronen des Farbstoffs und den Basen stabilisiert wird (Parish 1972; Le Bret, persönliche Mitteilung).

Die Zahl der an die RNA gebundenen Farbstoffmoleküle läßt sich leicht mit Hilfe eines Fluorometers bestimmen, weil der gebundene Farbstoff stärker fluoresziert als der freie. Die niedrigste Zahl an Bindungsorten für Ethidium Bromid enthielten S4-16S RNA Komplexe (53) und bei 60°C in TMK-Puffer vorinkubierte 16S RNA (Konformation $N_{1/2}$) (54). Mit 16S RNA, die bei 0°C in TMK-Puffer vorinkubiert wurde, traten 77 Farbstoffmoleküle in Wechselwirkung, und gegen TEN-Puffer dialysierte 16S RNA enthielt 160 Bindungsorte für Ethidium Bromid.

Die Ursache für die niedrige Zahl von Ethidium Bromid Bindungsorten auf 16S RNA in der Konformation $N_{1/2}$ liegt wahrscheinlich an der schlechten Zugänglichkeit doppelhelikaler RNA-Segmente für den Farbstoff. Eine weitere Möglichkeit, nämlich die Verringerung doppelhelikaler Bereiche während der Renaturierungsreaktion, scheidet aus, weil diese Veränderung nicht zu einer erhöhten RNase-Resistenz führen würde. Außerdem sollte ein Ausschmelzen von doppelhelikalen RNA-Segmenten spektrophotometrisch nachzuweisen sein (s.Abschn.5.3). Die schlechte Zugänglichkeit der doppelhelikalen Bereiche der RNA könnte zwei Ursachen haben:

1. Die Konformationsänderung führt zu einer sehr kompakten RNA-Struktur, die eine kleine Oberfläche besitzt. Viele helikale Segmente würden somit unerreichbar für Enzyme und kleine Moleküle im Innern des Moleküls liegen.

2. Interkalierungen in doppelhelikalen Segmenten von Nukleinsäuren sind nur möglich, wenn die Helices um etwa 12° aufgedreht werden. Erlaubt die kompakte 16S RNA-Konformation $N_{1/2}$ nur geringe Veränderungen in der räumlichen Ausrichtung der doppelhelikalen Bereiche, dann wird der Farbstoff nur an wenigen Stellen in der 16S RNA binden können.

Diese Hypothesen schließen einander nicht aus, und sie treffen wahrscheinlich auch beide zu.

Bollen & Herzog (1970) sättigten 16S RNA in Rekonstitutionspuffer bei 40°C mit dem Farbstoff Ethidium Bromid und titrierten anschließend mit dem Protein S4. Die Autoren zeigten, daß 5.4 % des gebundenen Farbstoffs im Verlauf der Bindungsreaktion von der RNA dissoziierten. Aus diesem Ergebnis wurde geschlossen, daß das Protein S4 doppelhelikale Bereiche der 16S RNA erkennt und mit ihnen in spezifische Wechselwirkung tritt.

Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß Bollen und Herzog in ihren Experimenten nur die Renaturierungsreaktion des S4 Bindungsortes auf der 16S RNA beobachtet haben, dessen Struktur bei 40°C in Gegenwart von S4 stabilisiert wird (s. auch Teil II: 4.7).

5.3 Vergleich der Hyperchromizität von nativer und denaturierter 16S RNA

Der Vergleich der UV-Schmelzkurve von 16S RNA, die bei 0°C in TMK vorinkubiert worden war, mit der von 16S RNA, die bei 60°C in TMK vorinkubiert worden war, ergab keine signifikanten Unterschiede im Schmelzverhalten der S4 bindenden und nicht bindenden RNA-Konformationen.

In einem weiteren Experiment wurde die Absorption denaturierter 16S RNA während der Renaturierung in TMK-Puffer gemessen. Es konnte gezeigt werden, daß sich die Absorption der 16S RNA im Verlauf der Renaturierungsreaktion nicht signifikant veränderte.
Die beiden Ergebnisse lassen mehrere Interpretationen zu:

1. Ein Ausschmelzen von doppelhelikalen Bereichen der RNA oder Knüpfung neuer Basenpaare findet während der Konformationsänderung ($D \longrightarrow N_{1/2}$) nicht statt.
2. Ausschmelzen und Neubildung doppelhelikaler Bereiche kompensieren einander und sind daher mit dieser Meßmethode nicht nachzuweisen.
3. Die Veränderungen in doppelhelikalen RNA Bereichen sind

sehr gering und können deshalb nicht mit dem Meßinstrument nachgewiesen werden.

5.4 Sedimentationsverhalten der verschiedenen RNA-Konformationen

In der hier vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede im Sedimentationsverhalten zwischen den 16S RNA Konformationen D und $N_{1/2}$ beobachtet werden.
Wahrscheinlich sind die hydrodynamischen Unterschiede zwischen den beiden Konformationen zu gering, um mit dieser Meßmethode nachgewiesen werden zu können.

5.5 Eigenschaften von 16S RNA, die unter denaturierenden Bedingungen aus 30S Untereinheiten extrahiert wird

Hochkeppel, Spicer und Craven (1976) berichteten kürzlich, daß zusätzlich zu den bisher bekannten primären 30S Bindungsproteinen die Proteine S3, S5, S9, S12, S13, S18 und möglicherweise S11 unabhängig von anderen Proteinen mit 16S RNA in spezifische Wechselwirkung treten können, wenn die RNA mit Essigsäure und Harnstoff aus den Ribosomen extrahiert wird.
An 16S RNA, die mit Phenol extrahiert wird, binden diese Proteine unter gleichen oder ähnlichen Versuchsbedingungen nicht (Schaup et al. 1970, 1971; Garrett et al. 1971; Held et al. 1974; Hochkeppel, Spicer & Craven 1976).

Die mit der Harnstoff/Essigsäure-Methode extrahierte 16S RNA scheint eine offenere Struktur als die RNA zu besitzen, die mit Phenol extrahiert wird. Gegenüber RNasen verhält sie sich empfindlicher und in Agarose-Polyacrylamid-Gelen besitzt sie eine geringere elektrophoretische Mobilität als die mit Phenol präparierte 16S RNA (Hochkeppel, Spicer & Craven 1976).

Es ist möglich, daß die von Hochkeppel und Mitarbeitern zusätzlich beschriebenen primären Bindungsproteine 16S RNA Strukturen erkennen, die sehr stabil sind (z.B. RNA-Sekundärstrukturen, wie das bei den Proteinen S8 und S15 der Fall ist (Ungewickell et al. 1975)) und nur in Abwesenheit einer RNA-Tertiär-

struktur erreichbar sind.
Wenn diese Hypothese zutrifft, dann sollten die neuen primären Bindungsproteine mit 16S RNA, die mit Phenol extrahiert wird, nach Zerstörung der Tertiärstruktur ebenfalls in spezifische Wechselwirkung treten können. Nähere Untersuchungen dazu werden zur Zeit durchgeführt.

5.6 Mögliche Funktion der Magnesium-Ionen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, daß 16S RNA in mindestens drei Konformationen vorliegen kann, die sich 1. in ihrer elektrophoretischen Mobilität in kombinierten Agarose-Polyacrylamid-Gelen, 2. in ihrer Fähigkeit, mit dem Protein S4 in spezifische Wechselwirkung zu treten, 3. in ihrer RNase-Resistenz und 4. in der Zugänglichkeit ihrer doppelhelikalen Bereiche für den Farbstoff Ethidium Bromid voneinander unterscheiden.

Es ist unwahrscheinlich, daß die Konformationen D und $N_{1/2}$ voneinander sehr unterschiedliche Sekundärstrukturen aufweisen, weil die RNA mit Methoden aus den Ribosomen extrahiert wurde, die nicht zur Denaturierung der Sekundärstruktur der RNA führen (s. "Methoden": 3.4.1).
Außerdem wäre die für die Renaturierungsreaktion berechnete Aktivierungsenergie von 39 000 cal mol^{-1} zu niedrig, um eine größere Anzahl von Basenpaaren aufzubrechen. Pro Basenpaar müßten im Durchschnitt 9000 cal mol^{-1} aufgewendet werden (Kallenbach 1968). Sehr viel wahrscheinlicher ist es dagegen, daß die untersuchten RNA-Konformationen sich in ihrer Tertiärstruktur voneinander unterscheiden.

Für die Bildung und Aufrechterhaltung der korrekten Tertiärstruktur der 16S RNA (die Konformation, die das Protein S4 spezifisch binden kann) sind Magnesium-Ionen unbedingt notwendig. Wahrscheinlich existieren ähnlich wie in $tRNA^{fMet}$ auch in der 16S RNA Struktur spezifische Bindungsorte für Magnesium-Ionen. Die 16S RNA Konformation, die mit dem Protein S4 nicht in eine spezifische Wechselwirkung treten kann, besitzt möglicherweise auch von Magnesium-Ionen abhängige Tertiärstrukturen, die aber

nur bei niedrigen Temperaturen stabil sind. Durch die Aktivierung bei mindestens 40°C werden diese metastabilen RNA-Konformationen aufgebrochen und "aktivierte" RNA-Moleküle gebildet, die während der Abkühlung Magnesium-Ionen spezifisch binden und die kompakte native Konformation N_2 einnehmen.

$$16S\ RNA_D + nMg^{2+} \xrightarrow{+E} 16S\ RNA^* \sim Mg_n^{2+} \xrightarrow{\text{Abkühlung}} 16S\ RNA_{N_2}\ Mg_n^{2+}$$

16S RNA* : "Aktivierte" RNA-Moleküle

C. Hauptteil II

Charakterisierung des spezifischen Bindungsortes von S4 auf der 16S RNA

1. Einführung

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß für die spezifische Bindung von S4 an die 16S RNA diese in einer definierten Konformation vorliegen muß, die nicht durch das Protein S4 induziert werden kann.

Das Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit bestand darin, mit biochemischen Methoden detaillierte Informationen über die Struktur der einander überlappenden Bindungsorte der Proteine S4 und S20, die innerhalb der 5'-Hälfte der 16S RNA lokalisiert sind, zu erhalten.
Außerdem sollte der Versuch unternommen werden, das S4-RNP im präparativen Maßstab darzustellen, um den Fragmentkomplex mit physikalisch-chemischen Meßmethoden untersuchen zu können.

2. Materialien

2.1	Bakterien-Nährmedien a) Hefe Extrakt b) Bacto-Pepton c) Casaminosäuren	Difco Laboratories, Detroit, USA
2.2	Phosphorus-32 (Orthophosphat in HCl, PBS.1)	Amersham Buchler, Braunschweig
2.3	Röntgenfilm (Curix RP 1)	Agfa-Gevaert, Belgien
2.4	Ribonuklease T_1 (RNase T_1)	Sankyo, Japan
2.5	RNase A	Sigma, London, England, und Worthington, Freehold, USA
2.6	Deoxyribonuklease I (DNase I)	Worthington
2.7	Chromatographie Papier DE 81 und 3 MM	Whatman, W & R Balston, England
2.8	Cellulose Acetat Chromatographie Streifen	Oxoid, London, England

3. Methoden

3.1 Präparation von ^{32}P radioaktiv markierter rRNA

3.1.1 Bakterienstamm:

Der Bakterienstamm E. coli MRE 600 (Cammack & Wade, 1965) wurde für diese Arbeit benutzt, weil die Einbauraten von ^{32}P in die rRNA dieses Bakterienstammes höher waren als bei E. coli A 19.

3.1.2 Wachstumsbedingungen:

E. coli MRE 600 wurde in einem Medium mit niedrigem Phosphatgehalt (L.P. Medium) nach Landy und Mitarbeitern (1967) in Gegenwart von 25 bis 40 mCi ^{32}P Orthophosphat gezogen.
Für das L.P. Medium wurden folgende Stammlösungen getrennt angesetzt und autoklaviert:

Lösung 1: 1.5 g KCl, 5.0 g NaCl, 1.0 g NH_4Cl, 2.0 g vitaminfreie Casaminosäuren.
2.0 g Bactopepton und 12.1 g Tris wurden in Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit konz. HCl auf 7.4 eingestellt, und anschließend wurde die Lösung auf einen Liter mit Wasser aufgefüllt.

Lösung 2: 20 % (Gewicht/Volumen) Glukose

Lösung 3: 0.1 M $MgSO_4$

Das komplette L.P. Medium enthielt 100 ml der Lösung 1, 2 ml der Lösung 2 und 1 ml der Lösung 3.
10 ml des L.P. Mediums wurden mit MRE 600 angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 100 ml L.P. Medium, das zusätzlich ^{32}P Orthophosphat enthielt, übertragen und im Wasserbad bei 37°C unter kräftigem Schütteln inkubiert.
Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet (nach ca. 2 bis 3 Stunden) und anschließend mit 20 ml 0.01 M Tris-Acetat, pH 7.4, 0.01 M Mg-Acetat und 0.006 M Mercaptoäthanol (Extraktionspuffer) in Gegenwart von 0.01 mg DNase gewaschen.

3.1.3 Isolierung der rRNA:

Die Zellen wurden zunächst aus dem Extraktionspuffer zentrifu-

giert (8000·g für 10 Minuten), anschließend bei -80°C eingefroren und in Gegenwart eines dreifachen Überschusses an Alcoa aufgetaut.
Die Mischung wurde mit Extraktionspuffer angefeuchtet, und mit Hilfe eines Glasstabes wurden die Zellwände der Bakterien zerrieben. Die Paste mit den aufgebrochenen Zellen wurde zweimal mit je 5 ml Extraktionspuffer extrahiert. Zellwände und Alcoa wurden anschließend abzentrifugiert (18 000·g für 20 Minuten). Die Ribosomen wurden durch Zentrifugation (100 000·g für 3 Std.) aus den gesammelten Überständen gewonnen und anschließend in 2 ml Phenol-Extraktionspuffer (0.1 M Na-Acetat, 0.001 M Mg-Acetat, 0.5 % Natriumlaurylsulfat, pH 5.0) aufgenommen.
Die Phenolextraktion wurde wie in Teil I (3.4.1) beschrieben durchgeführt. Alle Arbeitsschritte zur Isolierung der rRNA wurden, mit Ausnahme der Phenolextraktion, zwischen 0°C und 4°C durchgeführt. Die Phenolextraktion erfolgte bei Raumtemperatur.
Die spezifische Aktivität der isolierten rRNA lag zwischen $1 \cdot 10^9$ und $5 \cdot 10^9$ IpM/mg RNA.
Für einige Experimente wurde 16S RNA isoliert. Zu diesem Zweck wurden die Ribosomen durch Dialyse gegen TMA II Puffer (0.01 M Tris-HCl, pH 7.8, 0.0003 M $MgCl_2$, 0.03 M NH_4Cl und 0.006 M 2-Mercaptoäthanol) in ihre Untereinheiten dissoziiert, die mittels Zentrifugation durch einen 10-30%igen linearen Sucrose-Dichtegradienten in einem SW 27 Rotor voneinander getrennt wurden (15 Std. bei 23 000 UpM).

3.2 Hydrolysen mit T_1 RNase

3.2.1 Renaturierung der RNA und Komplexbildung:

88-200 µg [^{32}P] 16S oder [^{32}P] 16S + 23S RNA (ca. 10^5 bis 10^8 IpM) wurden in 50-100 µl TMK-Puffer bei 40°C inkubiert (s.auch Teil I, 3.6/3.7). Um S4-16S RNA oder S4-S20-16S RNA Komplexe zu erhalten, wurde die RNA unter gleichen Bedingungen in Gegenwart eines drei- bis fünffachen molaren Überschusses an den Proteinen S4 oder S4 und S20 inkubiert.

3.2.2 Hydrolysebedingungen:

Die proteinfreie RNA oder spezifische Protein-RNA Komplexe wur-

den 20 Minuten bei 0°C mit dem Enzym T_1 in Eppendorf-Reaktionsgefäßen inkubiert. Das Verhältnis zwischen Enzym und Substrat (Kunitz-Einheiten T_1/44 µg RNA) variierte zwischen 0.17 und 0.5 (das entspricht einem molaren Verhältnis von 0.012-0.046). T_1-Stammlösungen (10 000 Einheiten/ml H_2O) wurden bei -20°C aufbewahrt.

Renaturierte proteinfreie RNA und spezifische Protein-RNA Komplexe wurden unter identischen Bedingungen mit T_1-RNase inkubiert.

3.2.3. Polyacrylamidgel-Elektrophoresen zur Fraktionierung der Hydrolysate:

Bevor das Inkubationsgemisch zur Fraktionierung auf eine 8%ige Polyacrylamidgel-Platte (400 x 160 x 4 mm) aufgetragen wurde, wurden 10-20 µl einer 50%igen Sucrose- und 0.005%igen Bromphenolblaulösung (in TMK) zur Probe pipettiert, um deren Dichte zu erhöhen. Abhängig von der Anzahl und den Volumina der Proben wurden mit Hilfe von Kunststoffkämmen 3 bis 8 Taschen im Trenngel ausgeformt. Die Verbindung zwischen dem Kathodenpuffer-Reservoir und dem Polyacrylamidgel wurde durch eine Papierbrücke aus 3MM Papier hergestellt. Der Elektrophoresepuffer enthielt 0.02 M Tris-Acetat, pH 8.0, und 0.005 M Mg-Acetat. Der Puffer wurde während der Elektrophorese zwischen den Puffergefäßen mit Hilfe einer Kreiselpumpe zirkuliert. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug bei einer Spannung von 500 V und einer Stromstärke von 40 mA 15 Stunden. Während dieser Zeit wanderte der Farbstoff Bromphenolblau ca. 35 cm.

3.2.4 Anfertigung von Autoradiogrammen:

^{32}P radioaktiv markierte RNA-Fragmente und RNPs wurden mit Hilfe eines Autoradiogramms im Trenngel sichtbar gemacht. Zu diesem Zweck wurden Röntgenfilme (350 x 400 mm) auf die mit Parafilm abgedeckte Polyacrylamidgel-Platte gelegt. Abhängig von der spezifischen Aktivität der RNA variierten die Expositionszeiten zwischen 10 Minuten und 24 Stunden. Autoradiogramme wurden bei 4°C angefertigt, um die Diffusionsgeschwindigkeit der RNA im Polyacrylamidgel während der Exposition des Films zu verringern.

Weiter zu bearbeitende RNPs bzw. große resistente RNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell zur weiteren Analyse aus der Polyacrylamidgel-Platte geschnitten, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

3.3 Hydrolysen mit trägergebundener RNase A

3.3.1 Renaturierung der RNA und Komplexbildung:

Die Renaturierung der RNA und Komplexbildung wurden wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben durchgeführt.
Enzymatische Hydrolysen mit trägergebundener RNase A erforderten mindestens 400 µg RNA als Substrat, die in 50 µl TMK-Puffer gelöst wurden, weil sonst Pipettierfehler die Reproduzierbarkeit der Hydrolysen beeinträchtigten. Vorinkubationen und Komplexbildungen größerer Mengen an RNA (bis zu 17 mg) wurden in sterilen Zentrifugengläsern durchgeführt.

3.3.2 Hydrolysebedingungen:

3.3.2.1 Standardhydrolysen:

Renaturierte 16S RNA oder spezifische 16S RNA-Protein Komplexe wurden 5 Stunden bei 20°C mit trägergebundener RNase A inkubiert. Das Enzym-Substrat-Verhältnis betrug 0.002 (Einheiten/mg RNA). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Enzym aus der Lösung zentrifugiert (8000·g für 5 Minuten) und der Überstand auf 0°C abgekühlt.

3.3.2.2 Andere Hydrolysebedingungen:

In einigen Experimenten wurde renaturierte 16S RNA und S4-16S RNA Komplexe zunächst unter Standardbedingungen mit trägergebundener RNase A inkubiert. Nach vier Stunden wurde zu verschiedenen Proben ein zwei- bis fünffacher molarer Überschuß an S4, S20 oder L19 pipettiert und die Hydrolyse in Gegenwart eines dieser Proteine eine weitere Stunde lang fortgesetzt.

3.3.3 Fraktionierung der Hydrolysate:

3.3.3.1 Polyacrylamidgel-Elektrophoresen:

Die Hydrolysate ^{32}P markierter RNA oder Protein-RNA Komplexe

wurden in 5- oder 8%igen Polyacrylamidgel-Platten fraktioniert (s.Abschnitt 3.2.3).
Die Hydrolysate nicht radioaktiv markierter 16S RNA oder S4-16S RNA Komplexe wurden für analytische Zwecke in 5%igen Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (vgl.Teil I, 3.9.2). Die RNA im Polyacrylamidgel wurde mit Toluidin Blau oder Pyronin G spezifisch angefärbt. Der Protein-Teil von spezifischen RNPs wurde mit Coomassie Brilliant Blau spezifisch angefärbt.

3.3.3.2 Gelfiltration:

Um spezifische S4 RNA-Fragmente oder S4-RNPs präparativ zu isolieren, wurden die Hydrolysate von renaturierter 16S RNA bzw. spezifischer S4-16S RNA Komplexe (22 bis 44 mg RNA) mittels Gelfiltration durch Agarose A 0.5 bei 4°C fraktioniert. Die verwendeten Säulen maßen 200 x 3 cm, und als Elutionspuffer wurde 0.02 M Tris-HCl, pH 7.4, und 0.005 M $MgCl_2$ benutzt. Die Absorption des Eluats bei 254 nm wurde von einem LKB Uvicord System aufgezeichnet. Die Fraktionen, die die S4-RNA oder S4-RNPs enthielten, wurden gesammelt, und die RNA wurde nach Zusatz von zwei Volumina Äthanol 48 Stunden lang bei -20°C ausgefällt. Die Präzipitate wurden bis zur Verwendung entweder bei -80°C gelagert oder in TM Puffer (0.02 M Tris-HCl, pH 7.4, und 0.005 M $MgCl_2$) aufgenommen (Konzentration: 4 mg/ml) und in Aliquoten von 200 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.
Die Reinheit der S4 RNA-Fragmente und S4-RNPs wurde elektrophoretisch in 5%igen Polyacrylamid-Gelen überprüft. Der Elektrophoresepuffer hatte folgende Zusammensetzung: 0.02 M Tris-HCl, pH 7.4, und 0.005 M $MgCl_2$.

3.3.3.3 Zentrifugation in Sucrosegradienten:

Kontaminierte S4 RNA Fragmente wurden mittels Zentrifugation durch 12 ml 5-20%ige lineare Sucrose-Dichtegradienten in TMK Puffer aufgereinigt. Die Zentrifugation wurde 20 Stunden bei 33 000 UpM in einem Spinco SW 40 Rotor durchgeführt.

3.4 Fraktionierung von [^{32}P] RNA-Subfragmenten in Polyacrylamidgel-Platten

3.4.1 Denaturierung der RNPs und RNA-Fragmente:

Polyacrylamidgelstücke, die die S4 RNA-Fragmente oder spezifische RNPs enthielten, wurden mit einem Skalpell aus dem Trenngel geschnitten und 5 Stunden lang bei 25°C mit einer 8 molaren Harnstofflösung, die 0.001 % Bromphenolblau enthielt, inkubiert. Unter diesen Bedingungen werden die Wechselwirkungen zwischen Protein und RNA aufgehoben und intramolekulare Wechselwirkungen der RNA-Fragmente weitgehend aufgebrochen. Die durch die Sekundär- und Tertiärstruktur der RNA maskierten Enzymschnitte führen zu RNA-Subfragmenten, die elektrophoretisch in Polyacrylamidgel-Platten fraktioniert wurden.

3.4.2 Elektrophoresen in Harnstoff-Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgel-Platten:

Das Trenngel, das 7 M Harnstoff enthielt, setzte sich von oben nach unten aus folgenden Schichten zusammen:

1) 12%iges Polyacrylamidgel in 0.1% Natriumlaurylsulfat (1 cm)
2) 12%iges Polyacrylamidgel in TBE Puffer (0.09 M Tris-Borat, pH 8.3, und 0.0025 M EDTA) (6 cm)
3) 15%iges Polyacrylamidgel in TBE Puffer (12 cm)

Die äquilibrierten Probengelstücke wurden auf die oberste Schicht gelegt und in 12%iges Polyacrylamid, das 0.1 % Natriumlaurylsulfat enthielt, einpolymerisiert.
Der Elektrodenpuffer (TBE-Puffer) enthielt ebenfalls 7 M Harnstoff. Die Elektrophorese wurde bei 4°C 17 Stunden lang durchgeführt. Die Spannung betrug 500 V und die Stromstärke 70 mA.
Die Autoradiographie wurde wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben durchgeführt.
Expositionszeiten variierten zwischen zwei Stunden und zwei Wochen.
In den Experimenten, in denen die Sequenz einzelner Subfragmente mit Hilfe der Fingerprinttechnik analysiert werden sollte, wurden Subfragmente, die unzureichend voneinander getrennt worden waren, anschließend elektrophoretisch in 15- oder 20%igen Polyacrylamid-Gelen in Gegenwart von 7 M Harnstoff gereinigt.

3.5 Extraktion ^{32}P radioaktiv markierter S4-Fragmente, RNPs und RNA Subfragmente aus Polyacrylamidgel-Stücken

3.5.1 Elution intakter S4 RNA-Fragmente und RNPs:

Die Gelstücke mit den Proben wurden durch die Öffnung einer 2.5 ml Spritze gepreßt und anschließend das Homogenisat 24 Stunden in 2 bis 5 ml TMK-Puffer bei 4°C gerührt. Nach Beendigung des Elutionsschrittes wurde das homogenisierte Gel abzentrifugiert (5000·g für 30 Minuten) und der Überstand mit den RNA-Fragmenten oder RNPs abgegossen und aufbewahrt. Das Gel wurde mehrmals mit frischem TMK-Puffer gewaschen. Alle Überstände wurden zusammengegossen und entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren, oder die RNA bzw. RNPs wurden mit zwei Volumina Äthanol aus den Überständen gefällt und bei -20°C aufbewahrt.

3.5.2 Extraktion von RNA-Fragmenten mittels Phenol:

Die Gelstücke wurden mit Hilfe einer Spritze homogenisiert und anschließend in 3 ml 0.2 M NaCl, 0.01 M $MgCl_2$ und 0.1% Natriumlaurylsulfat suspendiert. Die Suspension wurde mit 3 ml Phenol, das zuvor mit Extraktionspuffer gesättigt worden war, versetzt. Die Extraktion wurde wie in Abschnitt 3.4.2 (Teil I) beschrieben in drei Zyklen durchgeführt.

3.5.3 Elektrophoretische Elution der RNA:

Die Gelstücke mit den RNA-Fragmenten wurden mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten und in zylindrische Glasröhrchen (100 x 9 mm) gesteckt. Die unteren Enden der Röhrchen waren zuvor mit DEAE Papier, das von Dialysemembranen nach außen geschützt und stabilisiert wurde, verschlossen. Die Membranen wurden durch ein Gummiband am Glasrand befestigt. Die Elektrophorese wurde in einer Shandon-Elektrophoresekammer durchgeführt. Der Elektrodenpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 0.002 M Na-Acetat, 0.04 M Tris-Acetat, pH 8.0, 0.001 M EDTA.
Bei einer Spannung von 60 V betrug die Laufzeit der Elektrophorese abhängig von der Größe der Fragmente und der Gelkonzentration 4 bis 8 Stunden. Die RNA wurde anschließend mit 30%igem Triäthylamin, pH 10, aus dem DEAE-Papier eluiert. Das Triäthyl-

amin wurde dann in einem Exsikkator, der an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, evaporiert. Um restliches Triäthylamin zu entfernen, wurde die RNA noch mehrmals mit Wasser gewaschen und lyophilisiert. Die elektrophoretische Elutionsmethode wurde nur in den Fällen angewendet, in denen die extrahierte RNA anschließend mit Hilfe der Fingerprinttechnik analysiert werden sollte.

3.6 Anfertigung von Oligonukleotidkarten

[^{32}P] RNA (Sub-) Fragmente wurden mit T_1 in Gegenwart von alkalischer Phosphatase hydrolysiert (Brownlee & Sanger 1967). Die Hydrolyseprodukte wurden anschließend elektrophoretisch in der ersten Dimension auf Cellulose-Acetat Streifen in 5% Essigsäure und 7 M Harnstoff, pH 3.5, fraktioniert. Für die Elektrophorese in der 2. Dimension wurden die Oligonukleotide auf DEAE-Papier übertragen und in 7%iger Ameisensäure fraktioniert (Sanger et al. 1965).
Die aufgetrennten T_1-Oligonukleotide wurden mit Hilfe eines Autoradiogramms lokalisiert, aus dem DEAE-Papier ausgeschnitten und mit Triäthylamin eluiert (s.Abschn. 3.5.3). Anschließend wurden sie mit RNase A hydrolysiert und auf DEAE-Papier, pH 3.5, elektrophoretisch in einer Dimension fraktioniert.
Die Position der T_1-Oligonukleotide auf dem Fingerprint und die Sekundäranalyse (nach der RNase A Spaltung) ermöglichte die Identifizierung aller großen T_1-Oligonukleotide der RNA (Sub)-Fragmente und ihre Lokalisation innerhalb der 16S RNA Sequenz.
Um Anfang und Ende eines RNA-Fragmentes eindeutig festlegen zu können, wurden diese außerdem mit RNase A hydrolysiert und Oligonukleotidkarten angefertigt.

3.7 Deproteinisierung von spezifischen [^{32}P] RNPs

2.7.1 Natriumlaurylsulfat-Methode:

Polyacrylamidgel-Stücke, die spezifische RNPs (ca. 10^5-10^6 IpM) enthielten, wurden mindestens 5 Stunden lang bei 20°C mit 0.008 M Tris-Acetat, pH 8.0, 0.001 M Mg-Acetat und 0.1% Natrium-

laurylsulfat äquilibriert. In einigen Experimenten wurden die Gelstücke nach 5 Stunden für 10 Minuten auf 40°C oder 50°C erwärmt.
Die Gelstücke wurden anschließend auf eine 10%ige Polyacrylamidgel-Platte (400 x 160 x 4 mm) polymerisiert; das Protein wurde elektrophoretisch von der RNA entfernt,und letztere wurde im Gel fraktioniert. Der Elektrodenpuffer enthielt 0.008 M Tris-Acetat, 0.001 M Mg-Acetat und 0.1% Natriumlaurylsulfat. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug bei einer Spannung von 200 V 20 Stunden. Während der Elektrophorese, die bei 18°C durchgeführt wurde, wurde der Puffer durch eine Kreiselpumpe zwischen Anoden- und Kathodenpuffer-Reservoir zirkuliert. Nach Anfertigung eines Autoradiogramms wurden die deproteinisierten RNA-Fragmente aus der Gelplatte ausgeschnitten, mit 8 molarem Harnstoff äquilibriert und elektrophoretisch in ihre Subfragmente fraktioniert (s.Abschn. 3.4.2).

3.7.2 Phenolextraktion:

Die RNA-Fragmente wurden mit Phenol aus dem Gel extrahiert und gleichzeitig deproteinisiert (vgl.Abschn.3.4.1, Teil I). In einigen Experimenten wurde die wässrige Phase, die die RNA enthält, durch Nitrocellulose-Membranen (45 µ) filtriert, um restliche Proteine zu entfernen.

3.7.3 Trypsinbehandlung:

Intakte S4-RNPs wurden aus dem Polyacrylamidgel eluiert (s.Abschnitt 3.5.1) und durch Zugabe von zwei Volumina Äthanol präzipitiert. Die RNPs wurden in 0.1 ml 0.008 M Tris-Acetat, pH 8.0, und 0.005 M Mg-Acetat gelöst und mit 1 µg S4 vermischt. Die Proben wurden anschließend mit 2.5 µg Trypsin zwei Stunden bei 10°C inkubiert. Unter diesen Hydrolysebedingungen dissoziiert an 16S RNA gebundenes S4 (Schulte, Schiltz & Garrett 1975; Newberry, persönliche Mitteilung).

Deproteinisierte RNA-Fragmente wurden in 10%igen Polyacrylamidgel-Platten bei 4°C fraktioniert. Der Elektrodenpuffer enthielt 0.008 M Tris-Acetat, pH 8.0, und 0.005 M Mg-Acetat. Bei einer Spannung von 200 V betrug die Laufzeit 16 Stunden. Der Elektrodenpuffer wurde zirkuliert. Die Subfragmente der deproteinisier-

ten RNA-Fragmente wurden unter denaturierenden Bedingungen in Polyacrylamidgel-Platten elektrophoretisch fraktioniert (s.Abschnitt 3.4.2).

3.8 Partielle Denaturierung der RNA-Fragmente mit ansteigenden Harnstoffkonzentrationen

Gelstücke mit [^{32}P] S4-F1 RNA wurden 4 Stunden bei 25°C gegen einen Puffer dialysiert, der 0.008 M Tris-Acetat, pH 8.0, und 0.001 M Mg-Acetat in 2, 4 oder 6 M Harnstoff enthielt. Die RNA-Dissoziationsprodukte wurden anschließend elektrophoretisch in 10%igen Polyacrylamidgel-Platten (200 x 160 x 4 mm) fraktioniert. Der Elektrodenpuffer entsprach in seiner Zusammensetzung dem jeweiligen Dialysepuffer. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 150 V 16 Stunden lang bei 4°C durchgeführt. Von den Gelplatten wurden Autoradiogramme angefertigt, und die RNA-Dissoziationsprodukte wurden aus der Gelplatte ausgeschnitten. Ihr Subfragmentgehalt wurde elektrophoretisch analysiert (s.Abschnitt 3.4.2).

3.9 Denaturierung und Rekonstitution der S4-F1 RNA

[^{32}P] S4-F1 RNA in TMK (ca. 5-8 ml) wurde 9 Stunden lang gegen 0.0025 M EDTA und 8 M Harnstoff, pH 5.9, dialysiert. Die RNA wurde dann im Dialyseschlauch für 5 Minuten auf 50°C erhitzt, um ihre Sekundär- und Tertiärstruktur vollständig aufzubrechen. Anschließend wurde die RNA 15 Stunden lang gegen doppelt destilliertes wasser dialysiert und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 20 µl Wasser aufgenommen und 5 Minuten lang auf 60°C erhitzt. Zu der erwärmten Lösung wurden 20 µl zweifach konzentrierter TMK-Puffer hinzugegeben. Die RNA-Lösung wurde für weitere 5 Minuten im Wasserbad belassen und anschließend an der Luft langsam auf 20°C abgekühlt.
Das Inkubationsgemisch wurde in einer 10%igen Polyacrylamidgel-Platte fraktioniert (Elektrodenpuffer: 0.008 M Tris-Acetat, pH 8.0, und 0.005 M Mg-Acetat).
Rekonstituierte RNA-Komplexe wurden aus der Gelplatte geschnitten und auf ihre Subfragmentzusammensetzung hin untersucht (s. Abschn. 3.4).

3.10 Rekonstitution des spezifischen Bindungsortes von S4 auf der 16S RNA ("S4-RNA") mit dem Protein S4

3.10.1 Rekonstitutionsexperimente mit [^{32}P] radioaktiv markierter "S4-RNA":

^{32}P "S4-RNA" (ca. 10 000 IpM) und 44 µg nicht radioaktiv markierte 16S RNA wurden in TMK-Puffer gelöst, in mehrere Aliquote aufgeteilt (200 µl) und mit einem drei- bis fünffachen molaren Überschuß an S4, S20, S8 und L24 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Inkubationsgemische durch Nitrocellulose-Membranen (45 µ) filtriert. Die Filter wurden zweimal mit je 1 ml TMK-Puffer nachgewaschen, getrocknet, und anschließend wurde die auf den Filtern zurückgehaltene Radioaktivität (Ĉerenkov-Strahlung) gemessen. Zur Kontrolle wurde die Retention der proteinfreien "S4-RNA" bestimmt.

3.10.2 Proteinbindungsexperimente mit nicht radioaktiv markierter "S4-RNA":

a) Elektrophoretische Methode: In mehreren Ansätzen (je 200 µl) wurde "S4-RNA", die mit RNase A dargestellt wurde ("S4-RNA$_{panc.}$"), mit einem drei- bis fünffachen molaren Überschuß an S4 unterschiedlich lange und bei verschiedenen Temperaturen in 0.5 ml TMK-Puffer inkubiert (s. "Resultate", 4.6), um die optimalen Rekonstitutionsbedingungen für dieses Fragment zu ermitteln. Nicht gebundene Proteine wurden mittels Zentrifugation durch einen 5-20%igen linearen Sucrose-Dichtegradienten entfernt (Zentrifugationsbedingungen: s.Abschn. 3.3.3.3).
Die RNPs wurden aus den gesammelten Gipfelfraktionen nach Zugabe von zwei Volumina Äthanol ausgefällt, in TM-Puffer aufgenommen und anschließend in 5%igen Polyacrylamid-Gelen fraktioniert (Zusammensetzung des Elektrodenpuffers: 0.02 M Tris-HCl, pH 7.4, und 0.005 M $MgCl_2$). Die RNA wurde im Gel mit Pyronin G, das Protein mit Coomassie Brilliant Blau spezifisch angefärbt.

b) Spektroskopische Methode: 44 µg der "S4-RNA$_{panc.}$" wurden in 2 ml TMK-Puffer gelöst und in eine Quarzküvette gefüllt. Absorptionsänderungen der "S4-RNA$_{panc.}$" (b. 20°C) während der Inkubation mit dem Protein S4 wurden bei 260 nm in einem Cary 16 Spektrophotometer gemessen. Kontrollmessungen wurden bei 320 nm

durchgeführt
In einem weiteren Experiment wurde die Absorptionsänderung der "S4-RNA$_{panc.}$" im Verlauf der Inkubation mit dem Protein L19 gemessen. Die Absorption der Proteine S4 und L19 bei 260 nm wurde bestimmt.

3.11 Untersuchungen über die Stabilität der "S4-RNA" und S4 RNPs

3.11.1 Magnesiumabhängigkeit:

Je 22 µg "S4-RNA$_{panc.}$" bzw. S4 RNP wurden in 5%igen Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch in Abwesenheit von Magnesium fraktioniert. Zusammensetzung des Elektrodenpuffers: 0.02 M Tris-HCl, pH 7.4, und 0.04 M NH_4Cl.

3.11.2 Temperaturabhängigkeit:

a) Hyperchromizitätsmessungen: 44 µg "S4-RNA$_{panc.}$" wurden in 2 ml 0.02 M Dimethylarsinsäure-Natriumsalz, 0.1 M KCl, 0.005 M $MgCl_2$ (pH 7.2) gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur entlüftet.
In Abhängigkeit von der Temperatur wurde die Zunahme der Absorption in einem Cary 16 Spektrophotometer gemessen (. Teil I, 3.10).
In einem zweiten Experiment wurden 44 µg "S4-RNA$_{panc.}$" und S4 RNP$_{panc.}$ in je 2 ml TMK-Puffer aufgenommen, und die Zunahme der Absorption bei 260 nm wurde in Abhängigkeit von der Temperatur zwischen 20°C und 55°C gemessen. Die Messungen konnten nicht auf höhere Temperaturbereiche ausgedehnt werden, weil der pH der Lösung bei höheren Temperaturen unter einen Wert von 6 fiel.

b) Elektrophoretische Methode: In verschiedenen Ansätzen wurden 13 µg "S4-RNA$_{panc.}$" bzw. S4 RNP$_{panc.}$ in 50 µl TMK-Puffer gelöst und fünf Minuten lang auf 30°C oder 44°C erwärmt und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Strukturveränderungen, die zur Denaturierung der RNA bzw. RNPs führten, wurden durch Elektrophoresen in 5%igen Polyacrylamid-Diskgelen sichtbar gemacht. Zusammensetzung des Elektrodenpuffers: 0.02 M Tris-HCl, pH 7.4, und 0.005 M $MgCl_2$.

3.12 Bindungsexperimente mit Ethidium Bromid

In verschiedenen Ansätzen wurden 18 µg "S4-$RNA_{panc.}$" in 2 ml TMK- oder TEN-Puffer gelöst. Zu den Proben und zu einer Referenz wurden schrittweise je 0.56 µg Ethidium-Bromid pipettiert. Die Bindung des Farbstoffs an die RNA wurde in einem Fluorometer verfolgt (s. Teil I, 3.11).

In einem weiteren Experiment wurden 18 µg S4-RNP, das mit RNase A dargestellt worden war ("S4-$RNP_{panc.}$"), in TM-Puffer gelöst und unter gleichen Versuchsbedingungen mit Ethidium-Bromid titriert.

4. Resultate

4.1 Kontrollierte enzymatische Hydrolyse spezifischer S4-16S RNA Komplexe, S4-S20-16S RNA Komplexe und proteinfreier RNA mit T_1-RNase

4.1.1 Die Primärstruktur der RNA-Teile von S4 Protein-RNA Fragmentkomplexen (S4-RNPs) und Positionen der Enzymschnitte

44 µg eines Gemischs von [^{32}P] markierter 16S und 23S RNA (ca. 10^8 IpM) wurden zusammen mit dem Protein S4 bei 40°C in TMK-Puffer inkubiert. S4 bindet unter diesen Bedingungen spezifisch an die 16S RNA (s.Einleitung und Teil I). Nach Inkubation der Komplexe mit 7, 12.5, 15, 20, 25, 30 und 35 Einheiten T_1 wurde das Hydrolysat in 8%igen Polyacrylamidgel-Platten elektrophoretisch fraktioniert.
Ein Gemisch proteinfreier [^{32}P] 16S und 23S RNA, das in TMK-Puffer in Abwesenheit von S4 inkubiert worden war, wurde unter gleichen Versuchsbedingungen mit 7, 12.5, 15 und 20 Einheiten T_1 hydrolysiert und anschließend neben den Hydrolysaten der S4-16S RNA Komplexe im Polyacrylamidgel elektrophoretisch fraktioniert.
In der Geltache A_1 (s.Autoradiogramm des Polyacrylamidgels in Abbildung 10) wurde das Hydrolysat des proteinfreien RNA-Gemischs aufgetragen, das unter den gleichen Bedingungen verdaut worden war wie die S4-16S RNA in der Geltasche A_2. In den Geltaschen B-H wurden die Hydrolysate von freier 16S und 23S RNA und an das Protein S4 gebundener 16S und proteinfreie 23S RNA, die mit ansteigenden Enzymkonzentrationen inkubiert worden waren (s. Legende zur Abbildung 10), aufgetragen.
Bei niedrigen Enzymkonzentrationen (7 Einheiten T_1) konnten aus dem Hydrolysat der S4-16S RNA Komplexe zwei spezifische S4 RNPs (RNP I; R_F: 0.09 und RNP II; R_F: 0.11) isoliert werden. In dem Hydrolysat der proteinfreien RNA, die unter den gleichen Bedingungen verdaut worden war, traten in ähnlichen Positionen zwei relativ große RNA Fragmente auf (K I; R_F: 0.1 und K II; R_F: 0.13).

Mit ansteigenden Enzymkonzentrationen erwiesen sich die RNA-Fragmente K I und K II als empfindlicher gegenüber T_1-RNase als

die spezifischen RNPs. Bei letzteren wurde mit ansteigenden Enzymkonzentrationen ein Übergang vom größeren S4-RNP I zum kleineren S4-RNP II beobachtet, der nach der Hydrolyse der S4-16S RNA Komplexe mit 25 Einheiten T_1 nahezu vollständig abgeschlossen war (s. Geltasche F in Abbildung 10). Höhere Enzymkonzentrationen verringerten die Ausbeuten an S4-RNP II, ohne daß ein neues kleineres S4-RNP im Polyacrylamidgel nachgewiesen werden konnte.
Aus den Ergebnissen der Enzymkinetik wurde geschlossen, daß das S4-RNP II das kleinste S4-RNP ist, das mit dem Enzym T_1 präpariert werden kann.

Für Rekonstitutionsexperimente wurde das S4-RNP II aus dem Polyacrylamidgel eluiert und anschließend mit Phenol deproteinisiert.
In TMK-Puffer wurde das Fragment (S4-RNA II) mit den Proteinen S4 und S8 inkubiert,und anschließend wurde die Retention der RNA auf Nitrocellulose Membranfiltern gemessen. Die Retention der proteinfreien S4-RNA II betrug 5 %, nach Inkubation mit S4 23 % und nach Inkubation mit S8 7 %. Diese Resultate zeigten, daß die S4-RNA den spezifischen Bindungsort von S4 auf der 16S RNA enthält.

Abbildung 10: Autoradiogramme von den Hydrolysaten unterschiedlich stark verdauter proteinfreier 16S + 23S RNA und S4-16S RNA Komplexen + 23S RNA, die in 8%igen Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch fraktioniert wurden. Der Elektrodenpuffer enthielt 0.02 M Tris-Acetat, pH 8.0, und 0.005 M Mg-Acetat.

A1, B1, C1 und D1: 16S + 23S RNA, die mit 7, 12.5, 15 und 20 Kunitz-Einheiten T_1-RNase pro 44/ug RNA inkubiert wurden.
A2, B2, C2, D2, E, F, G und H: S4-16S RNA Komplexe + 23S RNA, die mit 7, 12.5, 15, 20, 22.5, 25, 30 und 35 Einheiten T_1 RNase inkubiert wurden.

Abbildung 11: Autoradiogramm von den Subfragmenten des S4-RNP I

Das S4 RNP I wurde gegen 8 M Harnstoff dialysiert und in Gegenwart von 7 M Harnstoff und 0.1% Natriumlaurylsulfat elektrophoretisch fraktioniert (s. "Methoden": 3.4).
Die Sequenzen einiger Subfragmente sind in der Tabelle IV und der Abbildung 27 zu entnehmen.

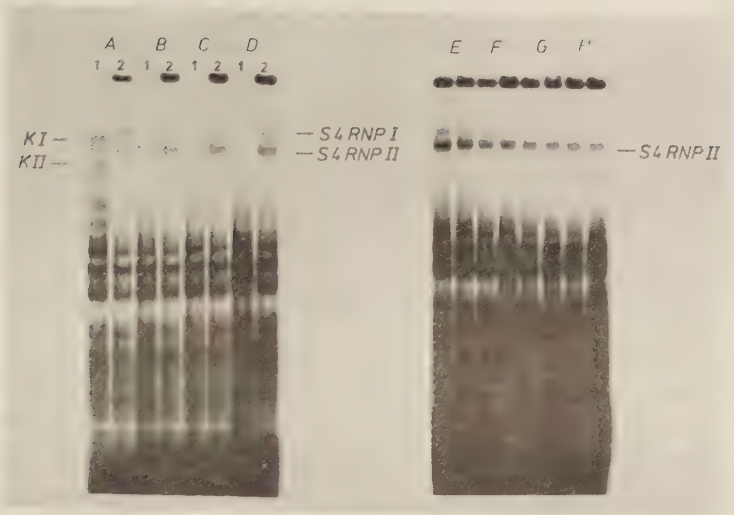


Abbildung 10:

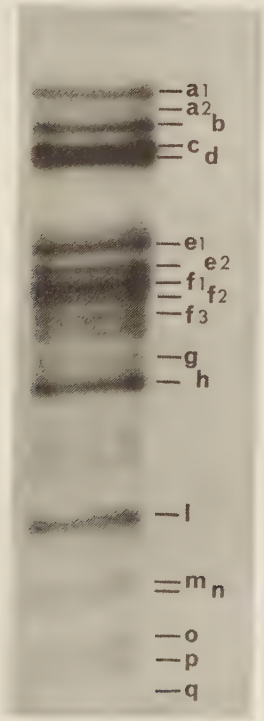


Abbildung 11:

Um die Sekundär- und Tertiärstruktur der RNA der S4-RNPs aufzubrechen und das Protein abzulösen, wurden die Gelstücke mit den Fragmentkomplexen aus der Polyacrylamidgel-Platte ausgeschnitten und gegen 8 molaren Harnstoff dialysiert. Die Aufhebung nichtkovalenter Bindungen innerhalb der RNA-Fragmente durch den Harnstoff enthüllte verdeckte Enzymschnitte, die zu RNA-Subfragmenten führen. In Gegenwart von 7 molarem Harnstoff wurden die Subfragmente elektrophoretisch in kombinierten 12- und 15%igen Polyacrylamidgel-Platten bei einem pH von 8.3 nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt.

Die Abbildung 11 zeigt die fraktionierten Subfragmente des S4-RNP I, das nach der Hydrolyse von S4-16S RNA Komplexen mit 7 Einheiten T_1 isoliert worden war. Bei höheren Enzymkonzentrationen änderte sich das Subfragmentmuster nicht, jedoch verringerten sich die Ausbeuten der Subfragmente a und e_1 geringfügig (Abbildung wird nicht gezeigt).

Die Autoradiogramme in den Abbildungen 12 a-c zeigen die Subfragmentmuster von S4-RNA II Fragmentkomplexen, die nach der Inkubation von S4-16S RNA Komplexen mit 7, 12.5 und 35 Einheiten T_1 aus dem Hydrolysat isoliert worden waren. Das Subfragmentmuster des S4-RNP II ist dem des S4-RNP I sehr ähnlich.

In Abhängigkeit von der Enzymkonzentration erhöhten sich die Intensitäten einiger kleiner Subfragmente auf Kosten der Subfragmente 1-3 (s. auch Tabelle III). Neue Subfragmente traten auch nach Hydrolysen, die in Gegenwart hoher Enzymkonzentrationen durchgeführt wurden, nicht auf.

Abbildung 12: Autoradiogramme von den Subfragmenten des S4-RNP II (s. auch Legende zu Abbildung 11). Die Sequenzen der Subfragmente sind der Tabelle III und der Abbildung 25 zu entnehmen.

Die verschiedenen S4-RNPs II wurden in Gegenwart unterschiedlich hoher Enzymkonzentrationen präpariert:

a) 7 Einheiten T_1
b) 12.5 Einheiten T_1 pro 44 µg RNA
c) 35 Einheiten T_1

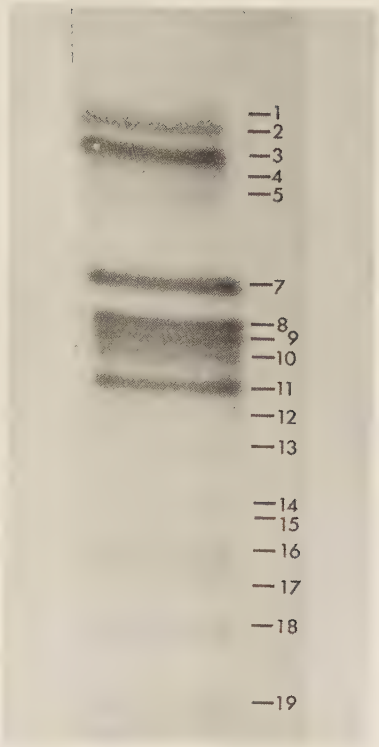


Abbildung 12 a:

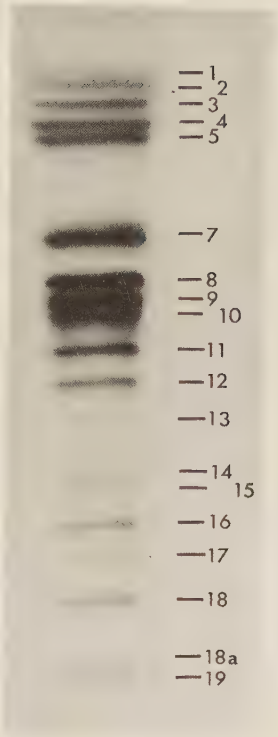


Abbildung 12 b:

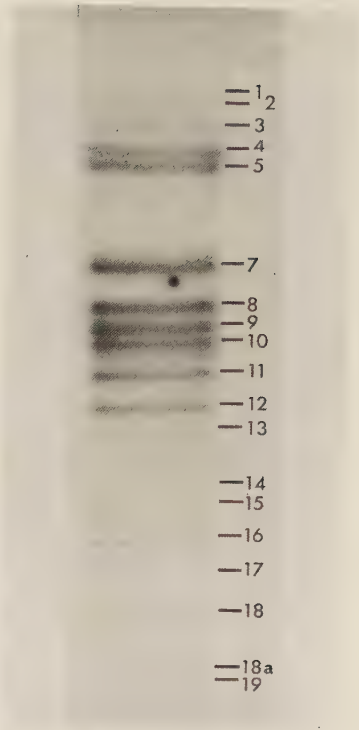


Abbildung 12 c:

Um die 16S RNA Bereiche zu identifizieren, die Bestandteile der beiden S4 Fragmentkomplexe sind, wurden beide RNPs aus dem Polyacrylamidgel eluiert und mit T_1-RNase vollständig hydrolysiert. Mit der Fingerprinttechnik (Sanger, Brownlee & Barrell 1965; Brownlee & Sanger 1969) wurden Oligonukleotidkarten angefertigt und mit denen der 16S RNA verglichen. Die Abbildungen 13 und 14 zeigen die Oligonukleotidkarten der S4-RNA I und II.

Die Sequenzen charakteristischer Oligonukleotide aus der S4-RNA I und II sind aus der Tabelle II zu ersehen.

Im Gegensatz zur S4-RNA I fehlten der S4-RNA II die Oligonukleotide 12 aus der Sektion C"; 23, 24 und 20 aus der Sektion L und 42, 45 und 49 aus den Sektionen D' und O der 16S RNA.
Die in beiden RNPs nachgewiesenen 16S RNA Bereiche sind in dem Blockdiagramm (Abbildung 15) verzeichnet.

Die S4-RNA I umfaßte etwa 530 Nukleotide und die S4-RNA II 447 Nukleotide. Beiden RNA-Fragmenten fehlten zwischen ihren 5'- und 3'-Enden unterschiedlich große RNA Bereiche, die zu Lücken innerhalb der Fragmente führten. In der S4-RNA I fehlten zwischen den Sektionen C" und D' 221 Nukleotide, die die Bindungsorte der primären Bindungsproteine S8 und S15 enthalten (Zimmermann et al. 1972; Ungewickell et al. 1975).
Weitere kleinere Lücken waren sowohl in der S4-RNA I als auch in der S4-RNA II in den Sektionen Q, R und G nachzuweisen. RNA-Bereiche aus den Sektionen M (Nukleotide 322-361) und C" (Nukleotide 517-532) waren in beiden Fragmenten nur submolar vertreten und können deshalb nur Bestandteil weniger RNPs sein.

Abbildung 13 und 14: T_1-Oligonukleotidkarten von der S4-RNA I (13) und der S4-RNA II (14)

Die Sequenzen der numerierten Flecken sind aus der Tabelle II zu entnehmen.

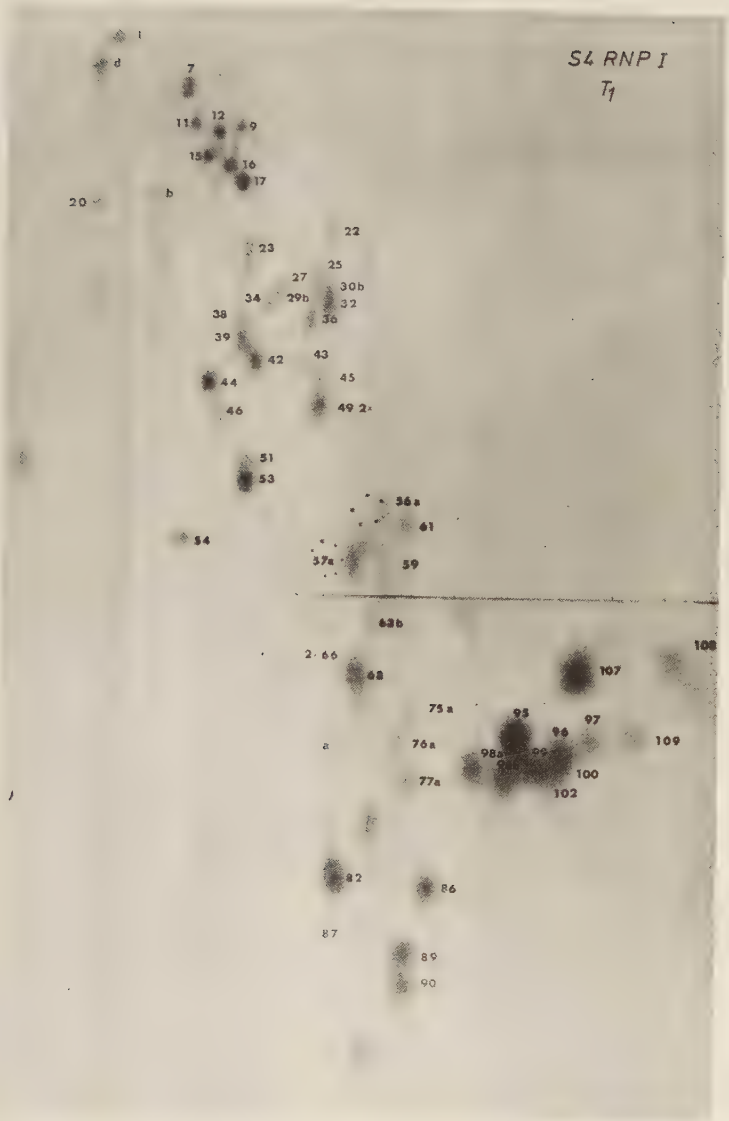


Abbildung 13:

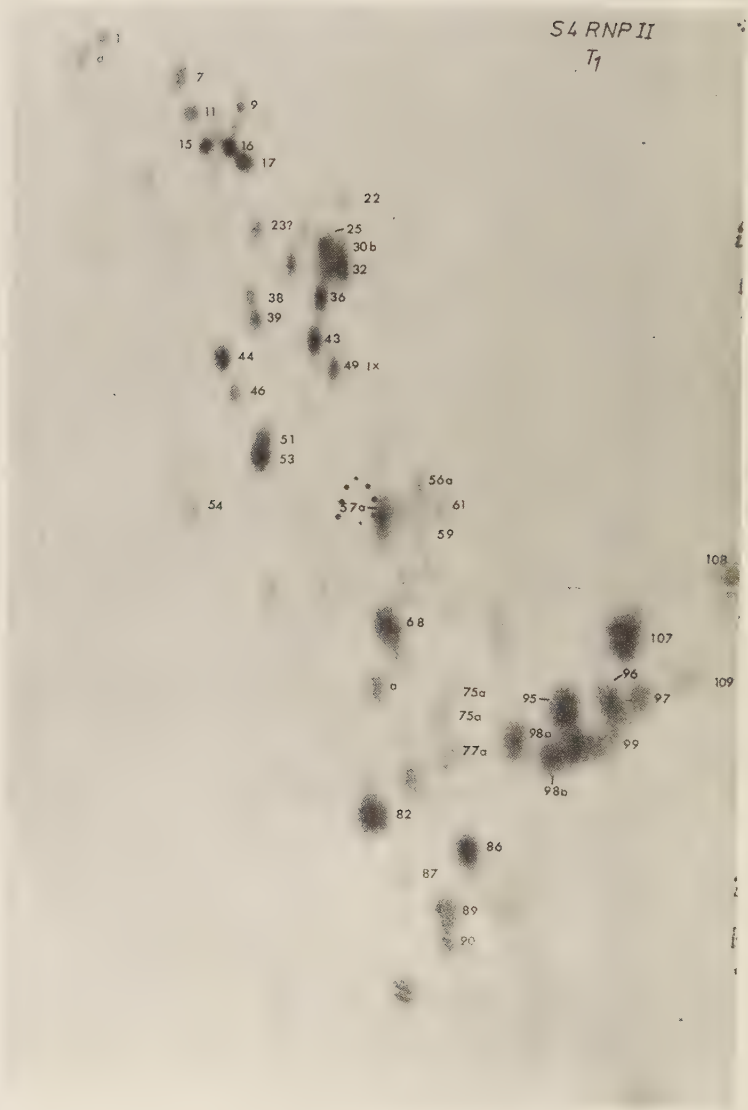


Abbildung 14:

Tabelle II: Die Sequenzen der Oligonukleotide, die in den S4 RNA I und II Fragmenten nachgewiesen wurden.

Fleck	Sequenz	Sektionen
1	U-C-U-A-A-U-A-C-U-U-U-G	I
7	U-A-C-U-U-U-C-A-G	I
9	A-U-A-A-C-A-C-U-U-G	H
11	A-A-U-A-U-U-G	B
15	U-U-A-A-U-C-G	C"
16	C-U-C-A-U-U-G	I
17	C-C-U-C-U-U-G	F
22	C(C,U)A-A-C-A-C-A-U-G	L
25	C-U-A-A-U-A-C-G	H
27	U-A-A-U-A-C-G	C"
29b	A-U(U,C_2)A-G	R
30b	A-C-U-C-C-U-A-C-G	M
32	C-U-A-A-C-U-C-C-G	C"
36	A-C-C-U-U-C-G	F
38	A-U-A-U-G	Q
39b	U-A-A-U-G	H'
42b	A-C-U-U-G	D'
43	U-U-A-C-C-C-G	I
44	A-U-U-G	L
45	C-C-C-U-U-G	D'
46	U-A-U-G	I'
49	C-C-U-U-C-G	I' und O
51	C-U-U-G	L
53	U-C-U-G	H',G
54	U-U-G	I'
56a	C-A-C-A-A-U-G	B
57a	A-A-A-C-U-G	H'
59	C-A-U-A-A-C-G	Q'
61	C-A-C-C-A-C-U-G	M
63b	U-A-A-C-A-G	L
66	U-A-A-A-G	I
68	A-A-C-U-G	M
75a	C-C-A-U-C-G	F
76a	C-C-A-U-G	B

Fortsetzung Tabelle II:

Fleck	Sequenz	Sektionen
77a/b	C-U-C-A-G oder/und U-C-C-A-G	L oder/und M
82	A-U-G	H',F,M,B
86	C-C-U-G	H',B
87	U-A-G	H
89	C-U-G	L,H",G
90	U-C-G	L,H
91	U-G (außerhalb)	H",Q',M,B,I,C"
92	A-A-A-C-G	H
^{i}94	A-A-A-G	F
95	A-A-G	L,I',I,I"
96	A-C-G	H",I
97	C-A-G	L,M,B,I
98a	A-A-C-G	L
99	C-A-A-G	L,Q',B,C"
^{i}100	A-C-C-G	Q'
^{i}101a	C-C-A-G	C"
102	C-C-C-A-G	F
104c/a	A-C-C-A-G oder/und A-C-A-C-G	M
106a	C(A,C)C-G	I
107	A-G	H",H',F,G,M,I,I"
108	C-G	L,B,I,C"
109	C-C-G	B
^{i}111	C-C-m^{7}G-C-G	C"
*d	C-U-U-U-U-G	H"
*b	C(U_2,C)G	H"
*a	nicht analysiert	
*e	nicht analysiert	

Die Oligonukleotidsequenzen wurden aus Fellner, Ehresmann und Ebel (1972) übernommen. Die Sequenz des Oligonukleotids 7 wurde von Uchida et al. (1974) geändert.
Die Flecken a*, b*, d* und e* beruhen auf Sequenzheterogenitäten. Die Oligonukleotide ^{i}94, ^{i}100, ^{i}101 und ^{i}111 waren auf den Oligonukleotidkarten entweder überhaupt nicht oder nur submolar nachzuweisen.

a) Die Positionen der Enzymschnitte in der S4-RNA II:

Die Sequenzen der isolierten S4-RNA II Subfragmente wurden bisher am gründlichsten untersucht, weil ein Ziel der Untersuchungen zunächst darin bestand, den kleinsten spezifischen Bindungsort von S4 auf der 16S RNA zu charakterisieren.
Erst kürzlich wurden die Untersuchungen auch auf die S4-RNA I ausgedehnt, deren Teilergebnisse im nächsten Abschnitt zusammengefaßt werden.

Die Gelstücke mit den Subfragmenten der S4-RNA II wurden aus den 12- und 15%igen Polyacrylamidgel-Platten ausgeschnitten, und alle RNA-Subfragmente, die nicht homogen erschienen, wurden anschließend elektrophoretisch in 15- oder 20%igen Polyacrylamidgel-Platten in Gegenwart von 7 molarem Harnstoff gereinigt.

Anschließend wurden die Subfragmente mit der elektrophoretischen Methode aus dem Polyacrylamidgel eluiert. Die eine Hälfte eines jeden Subfragments wurde mit T_1 und die andere mit RNase A vollständig hydrolysiert.
Die aus den enzymatischen Spaltungen hervorgegangenen unterschiedlichen Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Fingerprinttechnik analysiert (siehe Abbildungen 16 - 23).
Die Informationen aus RNase und T_1 Oligonukleotidkarten er-

Abbildung 15: Positionen der geschützten RNA des S4-RNP I, S4-RNP II, S4-S20-RNP I und S20-RNP II innerhalb des 16S RNA Moleküls.

Oligonukleotide aus den gestrichelt eingezeichneten RNA-Bereichen konnten nur in sehr geringen Ausbeuten nachgewiesen werden. Die Pfeile kennzeichnen die Positionen der Enzymschnitte:

Dicker Pfeil:	Schnitthäufigkeit $\geq$ 80 %
Mitteldicker Pfeil:	Schnitthäufigkeit 40 - 80 %
Dünner Pfeil:	Schnitthäufigkeit < 40 %

Die Zahlen an den Pfeilen geben die Entfernung des Enzymschnittes vom 5'-Terminus der 16S RNA in Nukleotiden an.

+ : Schnitthäufigkeit abhängig von der Enzymkonzentration
● : Schnitthäufigkeit abhängig von S4

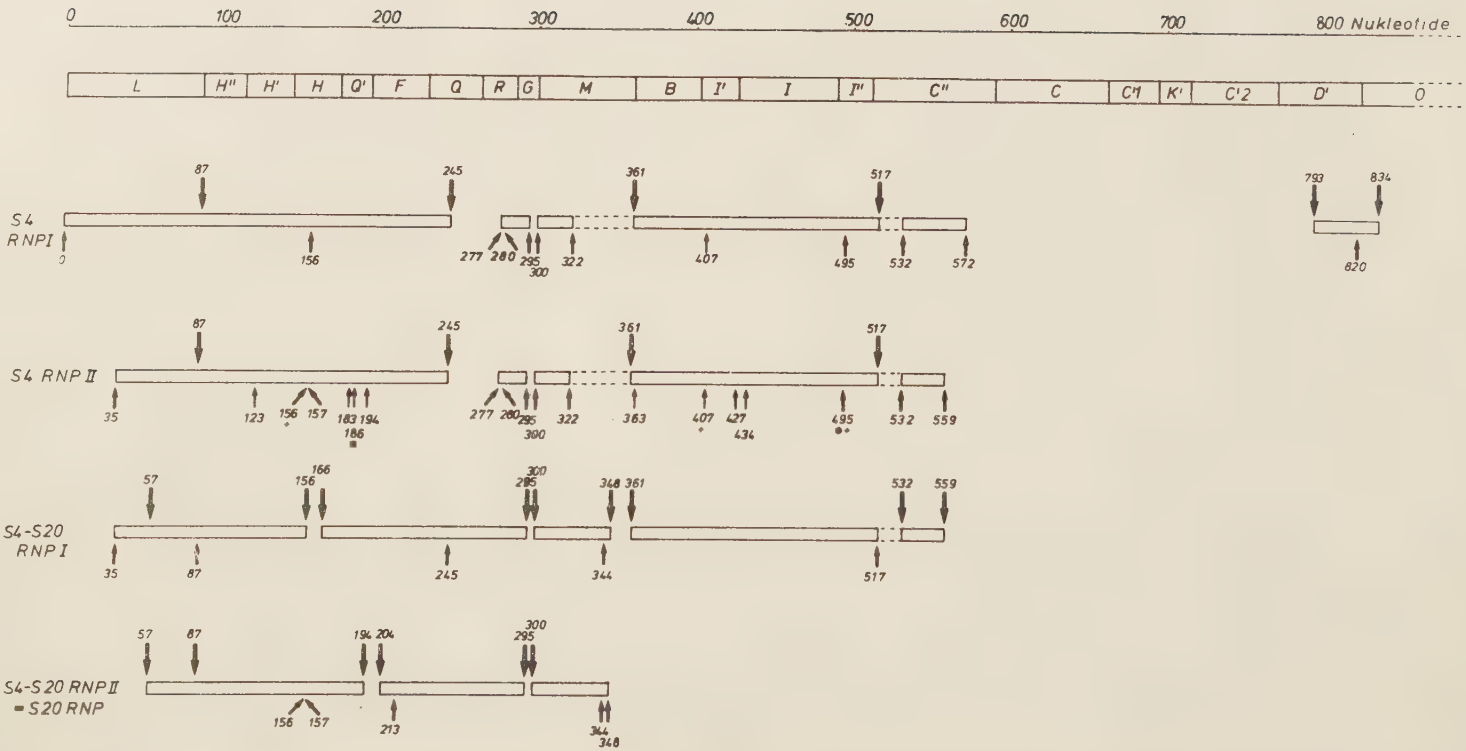


Abbildung 15:

möglichten die exakte Lokalisation der meisten Subfragmente innerhalb der 16S RNA und somit auch die Bestimmung der Positionen der Enzymschnitte in der S4-RNA II.

In der Tabelle III und dem Blockdiagramm in Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Sequenzanalysen der wichtigsten Subfragmente zusammengefaßt worden.

Die Abbildung 25 zeigt die von Ehresmann und Mitarbeitern (1972, 1975 a/b) vorgeschlagene Sekundärstruktur für die 16S RNA, in der die Positionen der Enzymschnitte entsprechend ihrer Häufigkeit eingezeichnet wurden.

b) Die Positionen der Enzymschnitte in der S4-RNA I

Die bisher ermittelten Ergebnisse über die Sequenzen einiger S4-RNA I Subfragmente und ihre Positionen in der 16S RNA wurden in der Tabelle IV und dem Blockdiagramm (Abbildung 26) zusammengefaßt. In die Abbildung 27, die die hypothetischen Sekundärstrukturen der 16S RNA zeigt, wurden die Enzymschnitte ihrer Häufigkeit entsprechend eingezeichnet.

Abbildungen 16 bis 23: Eine Auswahl von Oligonukleotidkarten verschiedener S4-RNA II Subfragmente.

16: T_1-Oligonukleotidkarte des Subfragments 3
17: T_1-Oligonukleotidkarte des Subfragments 8a
18: T_1-Oligonukleotidkarte des Subfragments 16
19: T_1-Oligonukleotidkarte des Subfragments 18
20: T_1-Oligonukleotidkarte des Subfragments 19

21: RNase A-Oligonukleotidkarte des Subfragments 16
22: RNase A-Oligonukleotidkarte des Subfragments 18
23: RNase A-Oligonukleotidkarte des Subfragments 19

Abbildung 16:

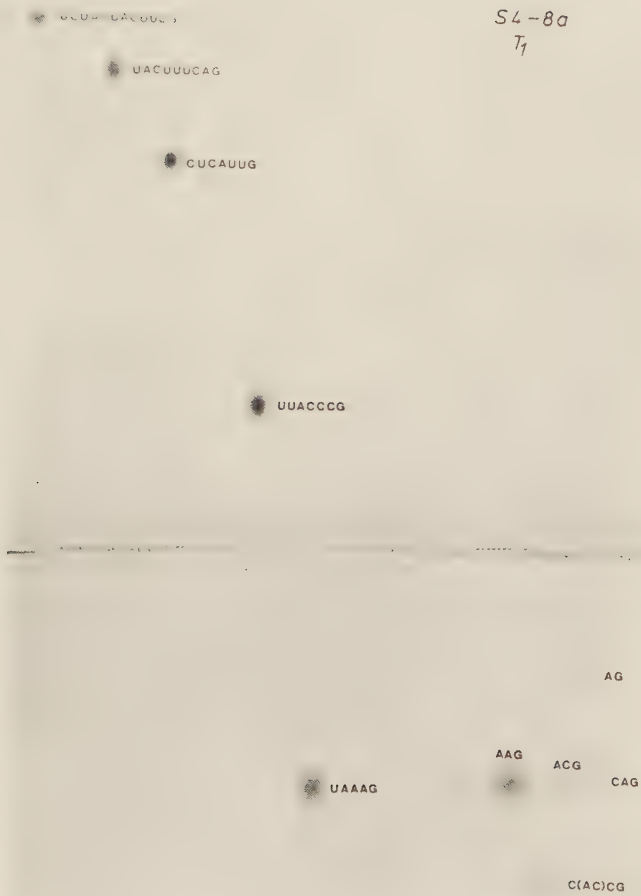


Abbildung 17:

Abbildung 18:

S4-18

Abbildung 19:

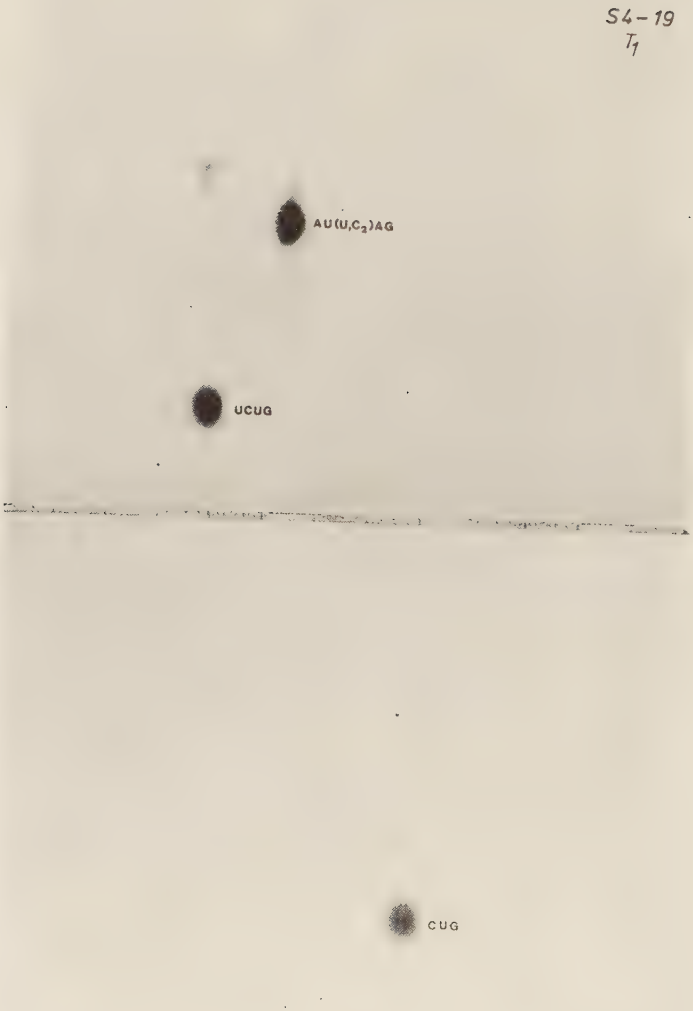


Abbildung 20:

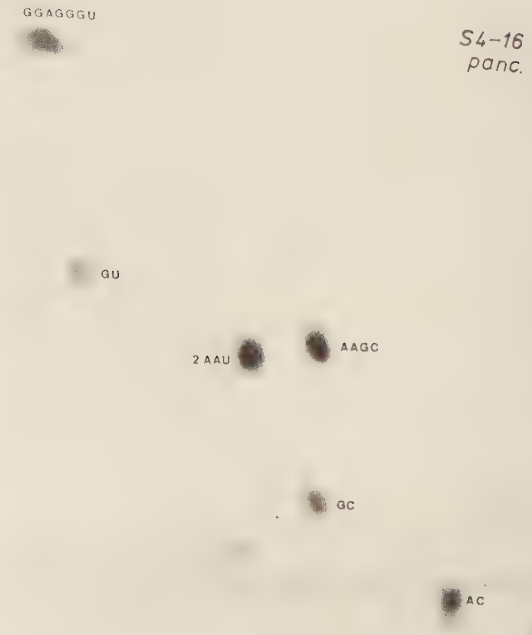


Abbildung 21:

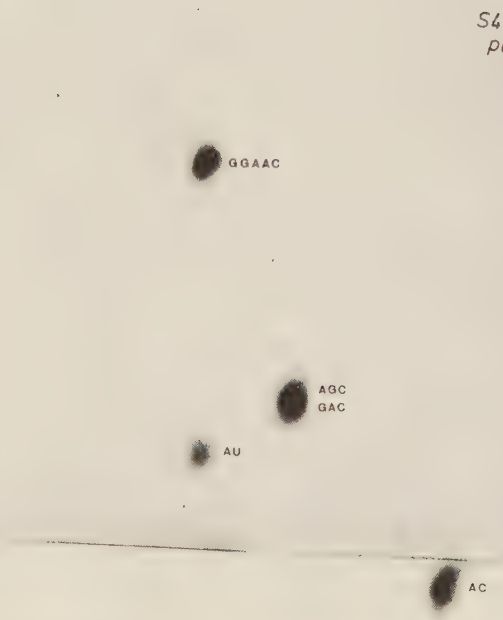


Abbildung 22:

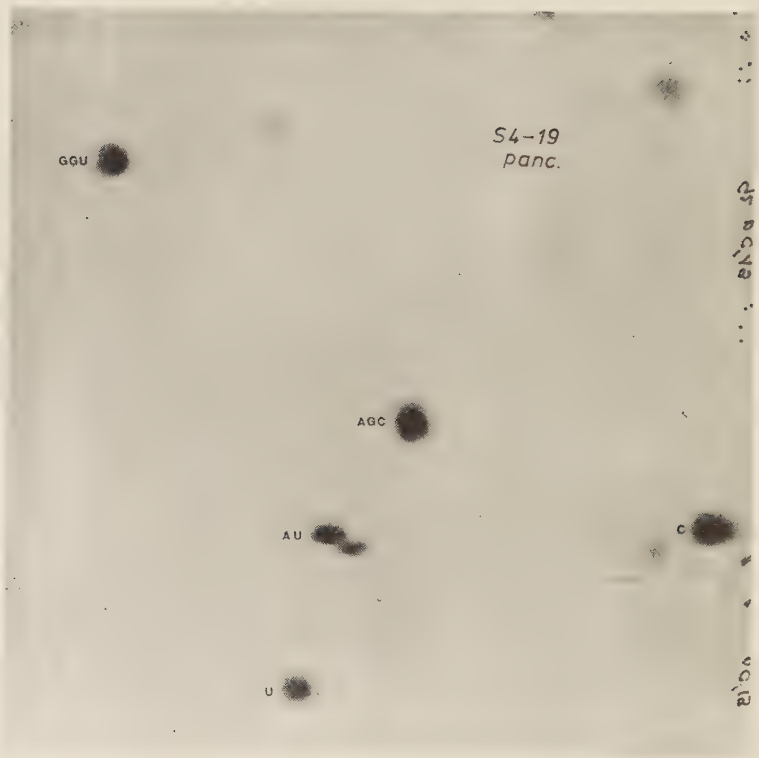


Abbildung 23:

Legende zu Tabelle III:

Die Subfragmentnummern (1. Spalte) entsprechen denen in Abb.12 (Autoradiogramm der fraktionierten S4-RNA II Subfragmente). Die zweite Spalte enthält die 16S RNA Sektionen, die aufgrund der Fingerprintanalysen in den jeweiligen Subfragmenten nachgewiesen wurden. Die eingeklammerten RNA Sektionen waren nicht vollständig in den Subfragmenten enthalten. Die Angaben zur Kettenlänge der Subfragmente (3.Spalte) beruhen auf den Sequenzergebnissen.
Um die Häufigkeiten der Subfragmente zu bestimmen, wurden ihre Intensitäten auf dem Röntgenfilm (Abb.12) mit einem Joyce Loebl Mikrodensitometer gemessen.

Tabelle III: Sequenzen und Häufigkeiten der Subfragmente der S4-RNA II

Fragmente	16S RNA Sektionen	Kettenlänge in Nukleotiden	relative Häufigkeit der Subfragmente in % RNP II a	RNP II b	RNP II c
1	(M) B I' I I" (C")	~ 180	5,4	2,0	1,3
2	(M) B I' I I" (C")	~ 180	8,0	4,5	1,3
3	B I' I I" (C")	160	13,7	5,9	2,2
4	H" H' H Q' F (Q)	150	4,0	6,1	6,7
5	B I' I	132	2,2	6,7	8,1
7	(H) Q' F (Q)	88	10,5	12,3	17,0
8	a) I b) H" H' (H)	66 67	11,8	12,8	12,2
9	H" H' (H)	66	10,5	12,8	11,0
10	a) I b) (Q') F (Q)	59	7,8	10,7	10,7
11	a) (L) b) F (Q)	52	10,0	8,0	7,4
12	B (I')	45	1,9	4,5	5,5
13	a) B b) (H') (H)	41	1,2	0,8	0
14/15	nicht analysiert	--	1,4	2,4	3,0
16	(C")	27	3,3	2,7	4,4
17	(H) (Q')	27	2,5	1,[illegible]	2,6
18	(M)	22	2,5	2,7	4,1
18a	(R) (G)	18	0	1,0	2,5
19	(R) (G)	15	3,2	2,2	2,7

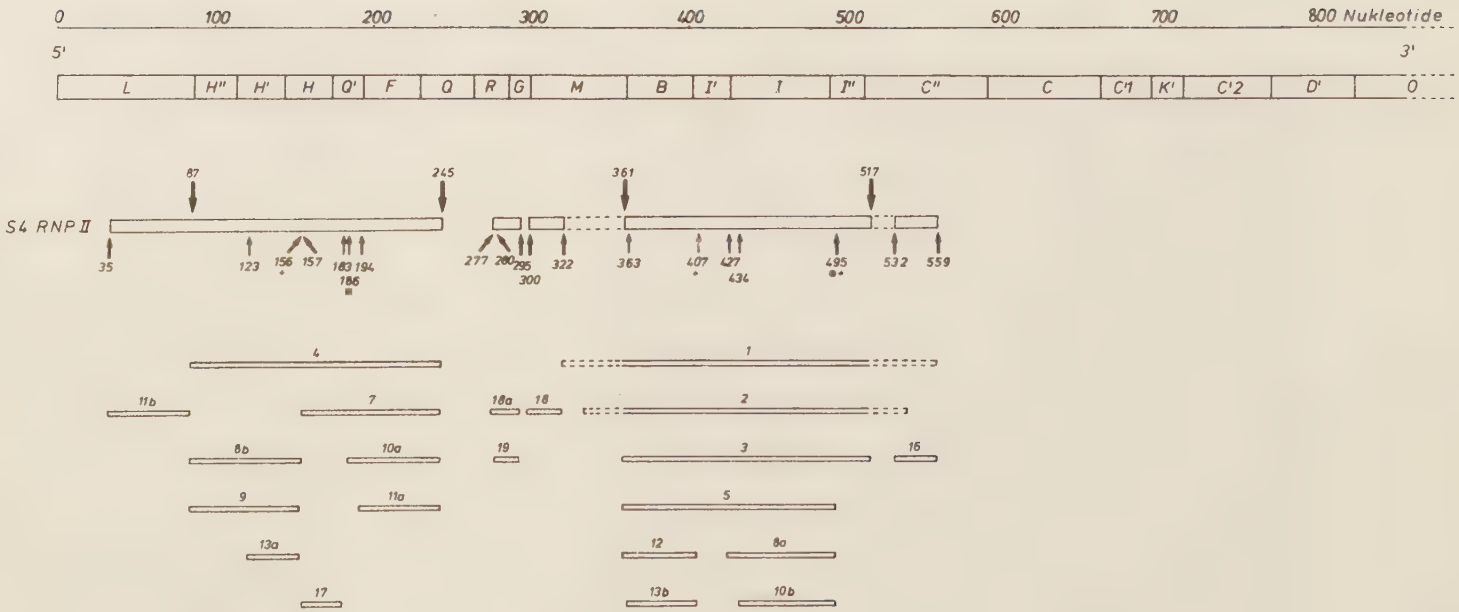


Abbildung 24: RNA-Subfragmentzusammensetzung des S4-RNPs II (s. auch Legende zur Abb.2).

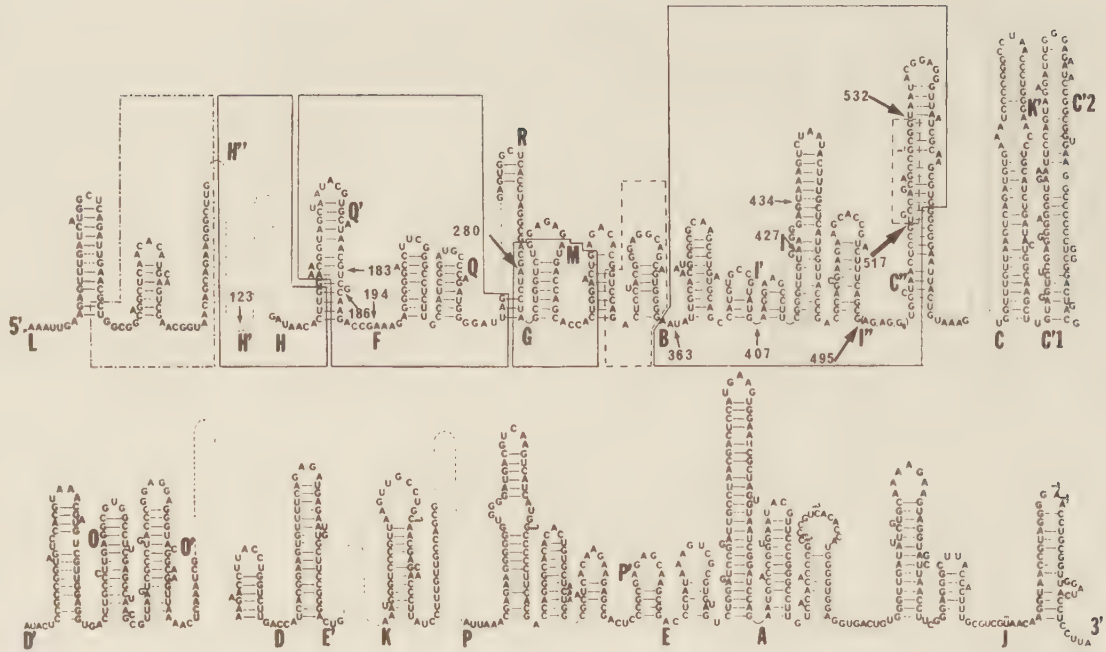


Abbildung 25: Primär- und hypothetische Sekundärstruktur der RNA des S4-RNP II.

Die eingerahmten Bereiche entsprechen den Sequenzen der "Muttersubfragmente", die unter denaturierenden Bedingungen in kombinierten 12- und 15%igen Polyacrylamid-Gelen fraktioniert wurden. Mit gestrichelten Linien wurden RNA-Bereiche eingerahmt, deren Oligonukleotide in geringeren Ausbeuten nachgewiesen wurden.

-.-.-.-.- : Niedrige Ausbeuten, --------- : sehr niedrige Ausbeuten

Tabelle IV: Sequenzen und Kettenlängen der Subfragmente der S4-RNA I (Erläuterungen s.Tab.III)

Subfragmente	16S RNA Sektionen	Kettenlänge in Nukleotiden
a_1	(M) B I' I I" (C")	~ 200
a_2	(M) B I' I I" (C")	~ 180
b	B I' I I" (C")	~ 160
c	H" H' H Q' F (Q)	~ 150
d	B I' I	132
e_1	(H) Q' F Q	88
e_2	(L)	~ 80
f_1	H" H' (H)	67 oder 66
l_2	(D' O)	26
m	(M)	22
n	(R) (G)	18
p_1	(R) (G)	15
p_2	a) (R) (G) b) O	14

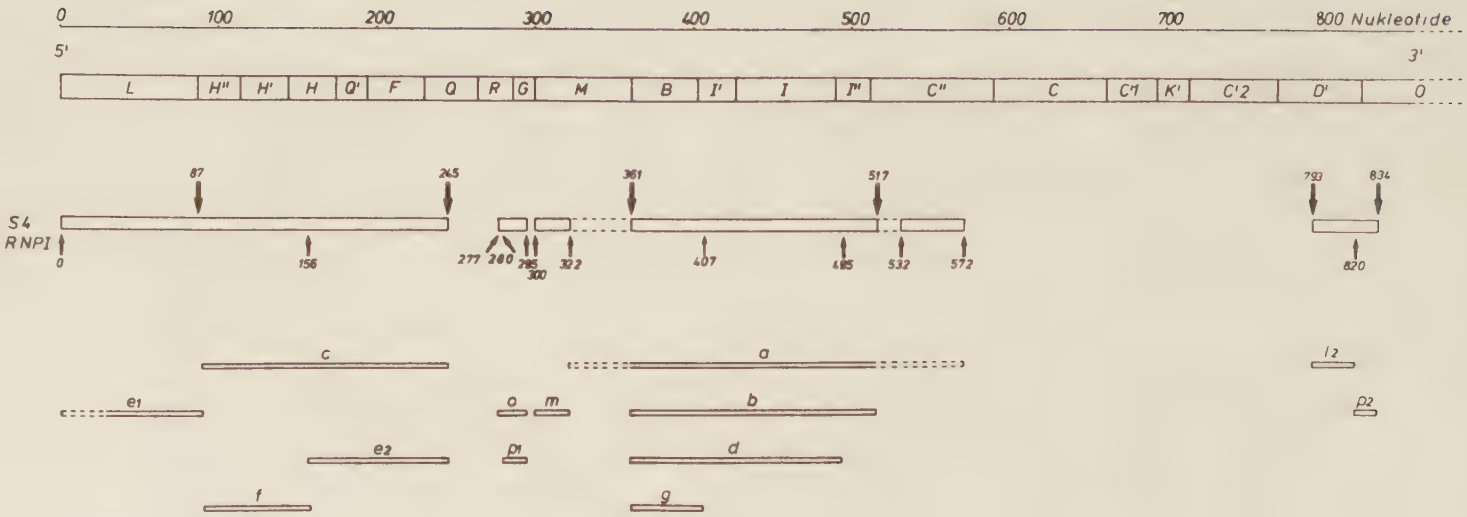


Abbildung 26: RNA-Subfragmentzusammensetzung des S4-RNPs I
(siehe auch Legende zur Abbildung 15)

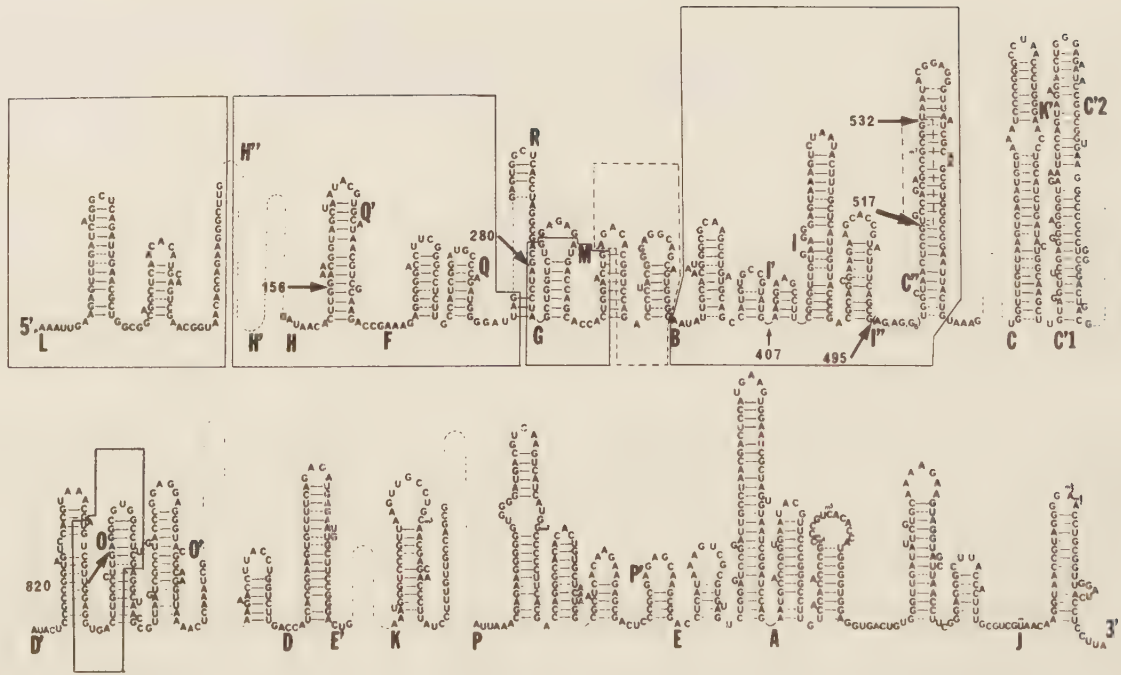


Abbildung 27: Primär- und hypothetische Sekundärstruktur der RNA des S4-RNPs I (Erklärungen siehe Legende zur Abbildung 26)

4.1.2 Die Primärstruktur der RNA-Teile von S4-S20-RNPs und die Positionen der Enzymschnitte

44 µg eines Gemischs von [^{32}P] markierter 16S und 23S RNA wurden mit den Proteinen S4 und S20 in TMK-Puffer bei 40°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen binden beide Proteine spezifisch an die 16S RNA. [^{32}P] 16S und 23S RNA wurden in Abwesenheit beider Proteine unter gleichen Bedingungen in TMK-Puffer inkubiert.
Nach Inkubation der Komplexe mit 35 Einheiten T_1 und anschließender Elektrophorese des Hydrolysats in 8%igen Polyacrylamidgel-Platten konnten zwei spezifische RNPs (S4-S20-RNP I, R_F: 0.1; S4-S20-RNP II, R_F: 0.23) isoliert werden (s. Abb.28). Im Hydrolysat der unter gleichen Bedingungen verdauten proteinfreien RNA konnte in geringen Ausbeuten nur ein großes resistentes RNA-Fragment nachgewiesen werden, das den gleichen R_F-Wert (0.13) aufwies wie die K II RNA (s. Abschn. 4.1.1).

Inkubationen spezifischer S4-S20-16S RNA Komplexe mit 40 Einheiten T_1 reduzierten die Ausbeuten beider RNPs gleichermaßen, ohne daß ein Übergang vom größeren RNP I zum kleineren RNP II beobachtet werden konnte (s. Abb. 28).
Die Gelzonen, die die beiden RNPs enthielten, wurden aus der Polyacrylamidgel-Platte ausgeschnitten und mit 8 molarem Harnstoff inkubiert. In einer kombinierten 12- und 15%igen Polyacrylamidgel-Platte wurden ihre Subfragmente in Gegenwart von 7 molarem Harnstoff bei einem pH von 8.3 nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt (s. Autoradiogramm in Abb. 29). Die Nukleotidsequenzen der einzelnen Subfragmente wurden mit Hilfe der Fingerprinttechnik analysiert.

In den Tabellen V und VI wurden die Sequenzen und Kettenlängen der Subfragmente beider RNPs zusammengefaßt. Die vor enzymatischer Hydrolyse geschützten Sequenzbereiche, die Lage der einzelnen Subfragmente und die Positionen der Enzymschnitte sind aus den Blockdiagrammen in den Abbildungen 30 und 31 zu ersehen. In die Abbildungen 32 und 33, die die hypothetische Sekundärstruktur der 16S RNA zeigen, wurden die Enzymschnitte innerhalb beider RNPs, ihrer Häufigkeit entsprechend, eingezeichnet.

Die S4-S20-RNA I, die 509 Nukleotide lang war, erstreckte sich über die gleichen 16S RNA Sektionen wie die S4-RNA II (s. auch Abb. 15). Zusätzlich wurden jedoch auch die Nukleotidbereiche 246-280 aus den Sektionen Q und R und der Nukleotidbereich 323-348 aus der Sektion M geschützt.

Dieses Resultat war zu erwarten, weil im spezifischen Bindungsbereich von S20, der mit dem von S4 überlappt, diese Nukleotidbereiche nachgewiesen wurden (Ungewickell et al. 1975). Die S4-S20-RNA I stellte somit das Resultat der Addition zweier Proteinbindungsorte auf der 16S RNA dar. Die Lücke in der Sektion H (157-166) war jedoch weder in der S4-RNA II noch in der S20-RNA (s. auch S4-S20-RNA II) nachzuweisen.

Die S4-S20 RNA II war identisch mit dem Bindungsort von S20 auf der 16S RNA, und auch die Positionen der Enzymschnitte stimmten mit denen in der S20 RNA überein.

Abbildung 28: Autoradiogramm der Hydrolysate von S4-S20-16S RNA Komplexen + 23S RNA und proteinfreier 16S RNA + 23S RNA, die in 8%igen Polyacrylamidgel-Platten elektrophoretisch fraktioniert wurden.

S4-S20-16S RNA Komplexe + 23S RNA und proteinfreie 16S + 23S RNA wurden mit 35 bzw. 40 Einheiten T_1 RNase pro 44/ug RNA hydrolysiert und in einem 8%igen Polyacrylamidgel, das 0.02 M Tris-Acetat, pH 8.0, und 0.005 M Mg-Acetat enthielt, elektrophoretisch aufgetrennt.

A1) Hydrolysat proteinfreier RNA (35 Einheiten T_1)
A2) Hydrolysat von S4-S20-16S RNA Komplexen + 23S RNA (35 Einheiten (T_1)
D) Hydrolysat von spezifischen S4-S20-16S RNA Komplexen + 23S RNA (40 Einheiten T_1)
B Hydrolysate von spezifischen S4- und S20-16S RNA Komplexen,
u.C) die zu Vergleichszwecken auf derselben Polyacrylamidgel-Platte fraktioniert wurden.

Abbildung 29: Autoradiogramm von den Subfragmenten der S4-S20-RNPs I und II

I: S4-S20-RNP I
II: S4-S20-RNP II = S20-RNP

Die Sequenzen der Subfragmente sind aus den Tabellen V und VI sowie den Abbildungen 32 und 33 zu ersehen.

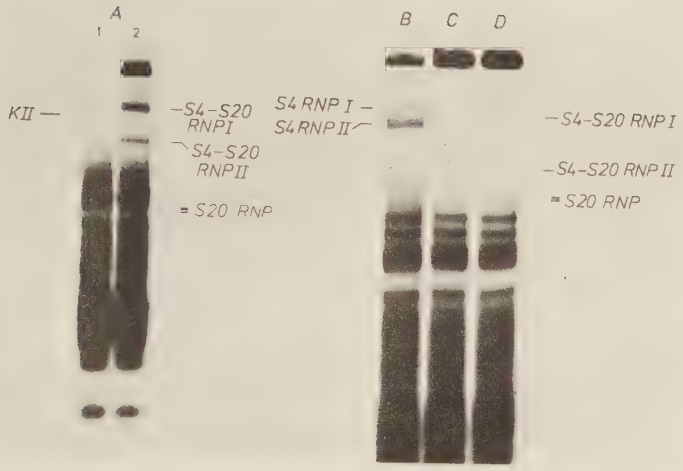


Abbildung 28:

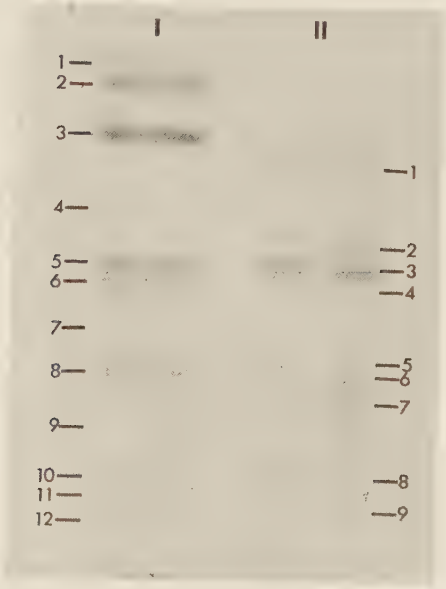


Abbildung 29:

Tabelle V: Sequenzen und Kettenlängen der Subfragmente der S4-S20-RNA I (Erläuterungen s. Tab. III)

Subfragmente	16S RNA Sektionen	Kettenlänge in Nukleotiden
1	B I' I I" (C")	180
2	B I'I I" (C")	160
3	(H) Q' F Q R (G)	140
4	(H) Q F (Q)	99
5	H" H' (H)	66
6	H" H' (H)	64
7	a) (L) b) (M)	52
8	(M)	43
9	nicht analysiert	~ 35
10	(L)	30
11	(C")	27
12	nicht analysiert	~ 22

Tabelle VI: Sequenzen und Kettenlängen der Subfragmente der S4-S20-RNA II (S20 RNA) (Erläuterungen s. Tab. III)

Subfragmente	16 S RNA Sektionen	Kettenlänge in Nukleotiden
1	H" H' H Q'	105
2	(F) Q R (G)	93
3	(F) Q R (G)	82
4	H" H' (H)	66
5	(M)	49
6	(M)	43
7	(H) Q' F	35
8	(L)	30
9	nicht analysiert	~ 25

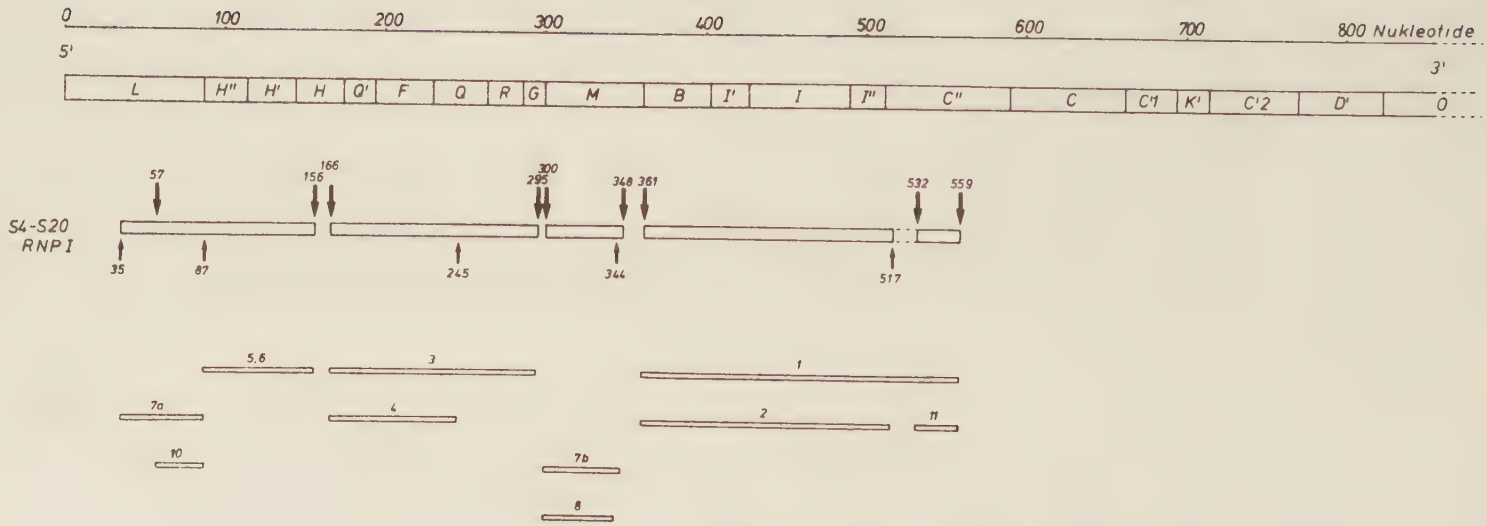


Abbildung 30: Subfragmentzusammensetzung des S4-S20-RNPs I

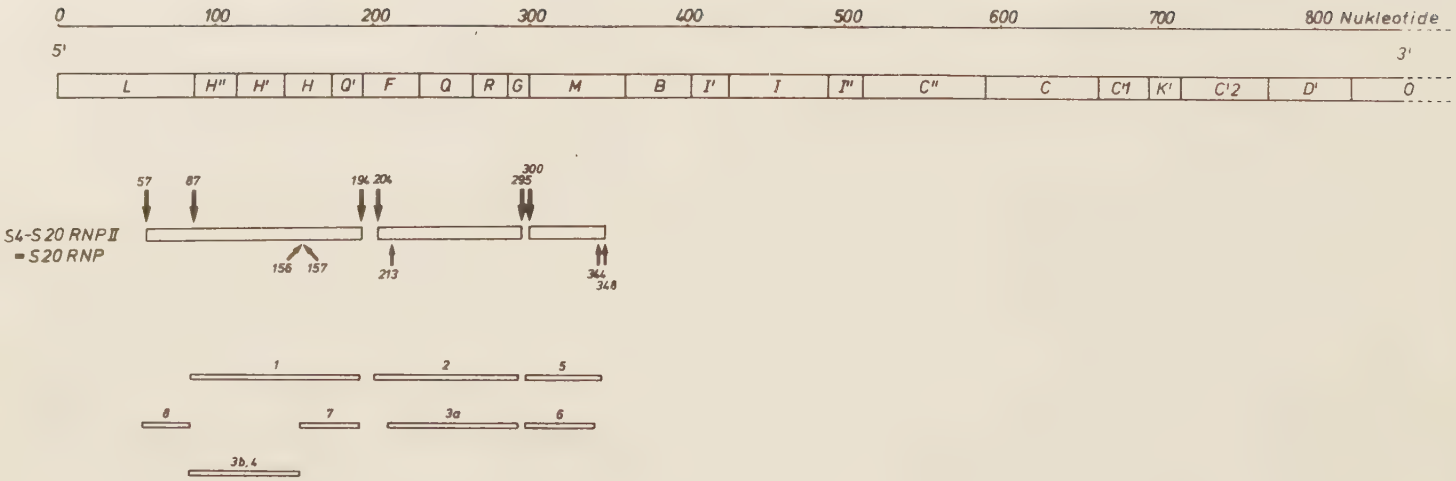


Abbildung 31: Subfragmentzusammensetzung des S4-S20-RNPs 11 (S20-RNP)

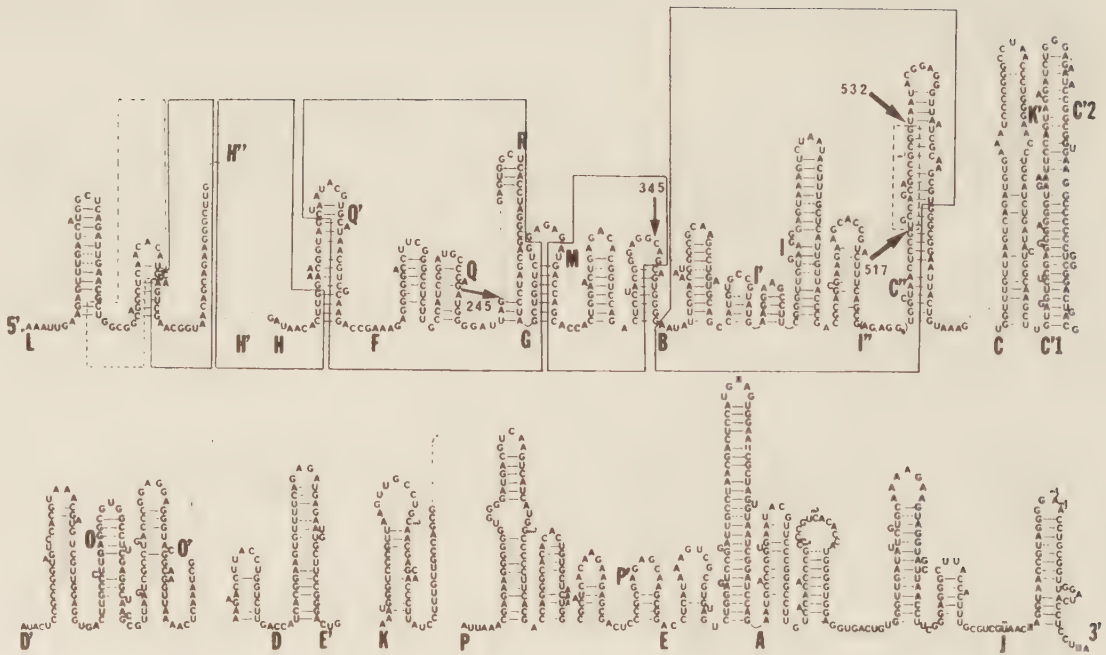


Abbildung 32: Primär- und hypothetische Sekundärstruktur der RNA des S4-S20-RNPs I

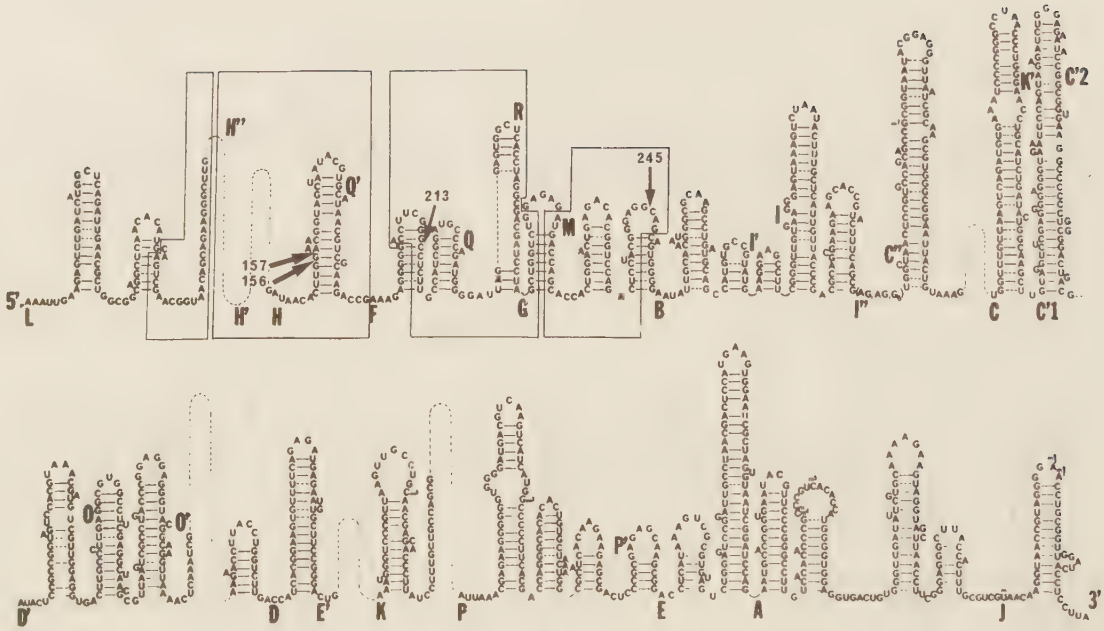


Abbildung 33: Primär- und hypothetische Sekundärstruktur der RNA des S4-S20-RNPs II (S20 RNPs)

4.2 RNA-RNA Wechselwirkungen zwischen Subfragmenten im Bindungsbereich von S4 und S20 auf der 16S RNA

Im letzten Kapitel wurde gezeigt, daß die RNA der in der vorliegenden Arbeit untersuchten spezifischen RNPs eine größere Anzahl Enzymschnitte in ihrem Rückgrat enthielt, die in einigen Fällen zu unterschiedlich großen Lücken (5-221 Nukleotide) innerhalb der Proteinbindungsstellen auf der RNA führte. Um zu prüfen, ob die durch Enzymschnitte und größere Lücken voneinander getrennten RNA-Subfragmente durch Protein-RNA oder RNA-RNA Wechselwirkungen (Sekundär- und/oder Tertiärstruktur) zusammengehalten werden, wurde folgende Strategie verfolgt:

Die spezifischen RNPs wurden mit unterschiedlichen Methoden (Natriumlaurylsulfat-, Phenol- oder Trypsinbehandlung) schonend in Gegenwart von Magnesium deproteinisiert. Anschließend wurde die proteinfreie RNA in Polyacrylamidgel-Platten elektrophoretisch fraktioniert.

Alle drei Methoden führten erfolgreich zu deproteinisierten Fragmenten. Durch Anfärben der Polyacrylamidgele mit proteinspezifischen Farbstoffen oder Bestimmung der Retention der RNA-Fragmente auf Nitrocellulose-Membranen wurde die vollständige Dissoziation des Proteins überprüft.

Als schonendste und auch bequemste Methode erwies sich die Deproteinisierung der RNPs mit Natriumlaurylsulfat, die daher auch in den meisten Experimenten verwendet wurde. Nachteile traten bei der Inkubation der RNPs mit Trypsin auf, weil die meisten kommerziellen Trypsinpräparate mit RNasen verunreinigt waren, die zum weiteren Abbau der RNA während der Inkubation mit dem Enzym führten.
Bei Entfernung der Proteine mit der Phenol-Methode bestand die Gefahr, kleinere RNA-Subfragmente während der Extraktion oder der sich anschließenden Äthanolfällung zu verlieren.

Durch kurzfristige Erwärmung der RNA-Fragmente oder Dialysen gegen ansteigende Harnstoffkonzentrationen wurde versucht, die Subfragmente oder RNA-Bereiche zu identifizieren, die durch starke RNA-RNA Wechselwirkungen miteinander verbunden waren.

Anhand der S4-RNA II wurde untersucht, welche Subfragmente

sich nach vollständiger Denaturierung des RNA-Fragments unter Rekonstitutionsbedingungen zu einem spezifischen RNA-Komplex zusammenlagern.

4.2.1 Deproteinisierung des S4-RNP II

Polyacrylamidgel-Stücke, die [^{32}P] markiertes S4-RNP II enthielten, wurden mehrere Stunden bei 20°C gegen 0.1% Natriumlaurylsulfat und 1 mM Mg^{2+} dialysiert und anschließend entweder bei 20°C belassen oder aber für fünf Minuten auf 40°C oder 50°C im Dialysepuffer erwärmt. In 10%igen Polyacrylamidgel-Platten wurde in Gegenwart von Natriumlaurylsulfat und Mg^{2+} das Protein elektrophoretisch von der RNA getrennt und letztere fraktioniert (s. Abb. 34). Dieser Versuchsansatz kombinierte die Deproteinisierung mit einer Untersuchung der thermischen Stabilität der deproteinisierten S4 RNA Fragmente.

Die RNA aus dem S4-RNP II, die nur auf 20°C erwärmt worden war, wanderte im Polyacrylamidgel vorwiegend in einer Bande (S4-F1 RNA), die eine ähnliche Wanderungsgeschwindigkeit (R_F 0.1) auf-

---

Abbildung 34: Autoradiogramm der deproteinisierten S4-RNA II.
Das S4-RNP II wurde bei 20°C gegen 0.1% Natriumlaurylsulfat in 0.001 M Mg-Acetat und 0.008 M Tris-Acetat, pH 8.0, dialysiert und anschließend kurzfristig auf 40 bzw. 50°C erwärmt (s. "Methoden": 3.7.1). In 10%igen Polyacrylamidgel-Platten, die mit Dialysepuffer äquilibriert worden waren, wurde das Protein von der RNA entfernt und letztere fraktioniert. Die numerierten RNA-Fragmente wurden aus der Gelplatte ausgeschnitten und auf ihren Subfragmentgehalt hin untersucht.

Abbildung 35: Autoradiogramm von den Subfragmenten der RNA-Dissoziationsprodukte der S4-RNA II
Die S4-F1 RNA und andere Dissoziationsprodukte der S4-RNA II wurden unter denaturierenden Bedingungen in einer kombinierten 12- und 15%igen Polyacrylamidgel-Platte elektrophoretisch in ihre Subfragmente aufgetrennt.
Um die Identifizierung der Subfragmente zu erleichtern, wurde ein intaktes S4-RNP II in seine Subfragmente dissoziiert und auf derselben Polyacrylamidgel-Platte fraktioniert (Referenzgelsystem).

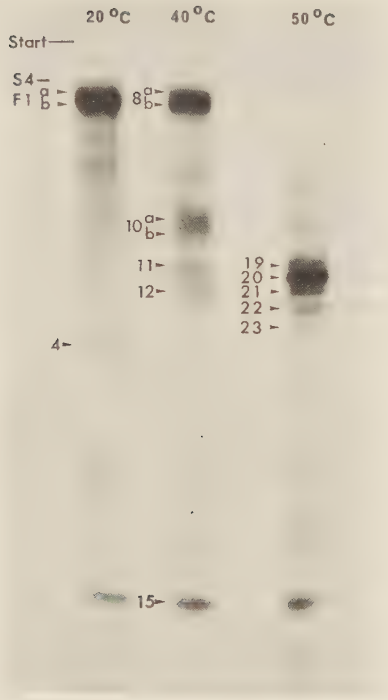


Abbildung 34:

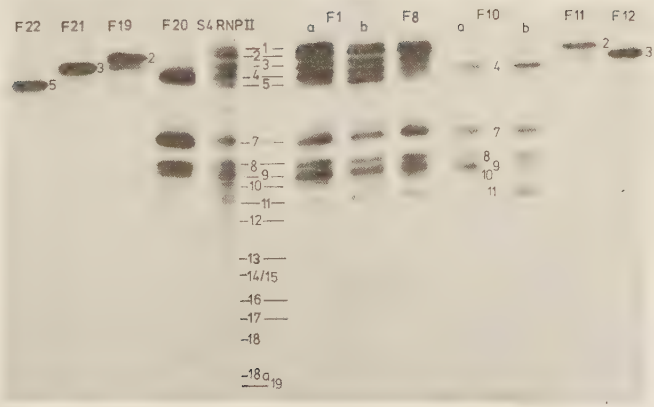


Abbildung 35:

wies wie das S4-RNP II. Die übrige RNA, die eine größere elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit besaß, bildete nur wenige deutliche Banden aus und verteilte sich über das gesamte Trenngel.

Aus dem Polyacrylamidgel eluierte S4-F1 RNA wurde mit frischem S4 in TMK-Puffer inkubiert und anschließend durch Nitrocellulose-Membranfilter filtriert. Kontrollexperimente wurden mit den Proteinen S8 und L24 durchgeführt. Aus den Ergebnissen, die in der Tabelle VII zusammengefaßt wurden, ging hervor, daß die S4-F1 RNA nicht die Fähigkeit verloren hatte, mit dem Protein S4 in spezifische Wechselwirkung zu treten.

Tabelle VII: Proteinbindung an die S4-F1 RNA

[^{32}P] S4-F1 RNA

Proben-Nummer	Protein	% Retention auf den Nitrocellulose-Membranfiltern
1	-	4
2	S4	22
3	S8	7
4	L24	8

Jedes Bindungsexperiment wurde dreifach durchgeführt. In Spalte 3 wurden die Mittelwerte der Retention in % S4-F1 eingetragen. Die Streuung der Ergebnisse betrug maximal ± 10 %.

Nach Erwärmung der RNA des S4-RNP II auf 40°C verringerten sich die Ausbeuten an S4-F1 RNA, und im Gel konnten neue Banden mit größerer elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit nachgewiesen werden (s. Abb. 34).
Bei einer Temperatur von 50°C dissoziierte die S4-F1 RNA vollständig in kleinere Fragmente (s. Abb. 34).
Alle im Gel gut getrennten RNA-Fragmente ausreichender Radioaktivität wurden unter denaturierenden Bedingungen in kombinierten 12- und 15%igen Polyacrylamidgel-Platten elektrophoretisch

in ihre Subfragmente aufgetrennt.
Um die Identifizierung der Subfragmente zu erleichtern, wurde auf derselben Gelplatte ein intaktes S4-RNP II in seine RNA-Subfragmente aufgetrennt.
Die Abbildung 35 zeigt ein Autoradiogramm von dem Subfragmentmuster der S4-F1, F8, F10, F11, F12, F19, F20, F21 und F22 RNA. Die Banden F1 und F10 wurden waagerecht in zwei Hälften geteilt (a und b) und getrennt analysiert, weil sie sehr heterogen erschienen. Es konnte jedoch in beiden Fällen kein Unterschied im Subfragmentmuster zwischen dem oberen und unteren Teil der Banden festgestellt werden.

Aus der Subfragmentzusammensetzung der S4-F1 RNA ist ersichtlich (s. auch Tab.VIII und Blockdiagramm in Abb.36), daß die Subfragmente, die Teile der zentralen Regionen M, R und G re-

Tabelle VIII: Subfragmentzusammensetzung des S4-RNP II und der S4-F1 RNA

S4-RNA II Subfragmente	relative Häufigkeit der Subfragmente in % S4-RNP II	S4-F1 RNA
1	8,8	11,8
2	9,2	13,1
3	10,5	13,5
4	10,0	12,9
5	6,6	4,9
7	10,3	9,7
8	8,2	7,9
9	9,6	10,6
10	7,6	4,9
11	5,1	2,7
12	3,3	0,3
13	0,6	6,1
14/15	1,2	0
16	2,9	2,2
17	1,9	1,1
18	2,0	0
18a	1,5	0
19	2,0	0

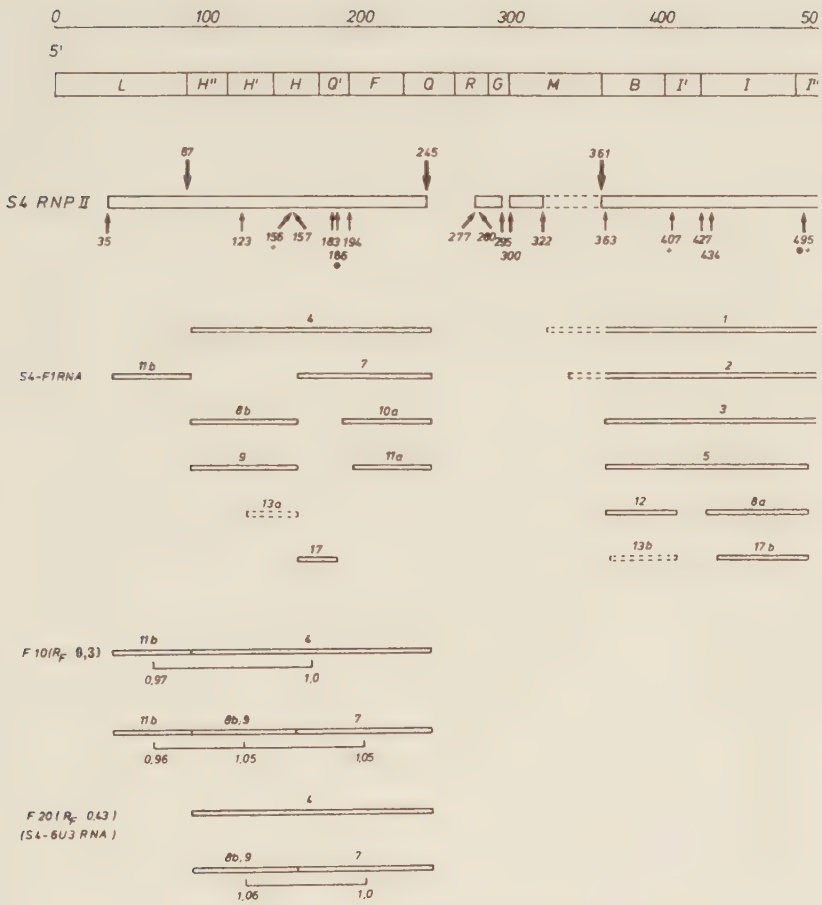
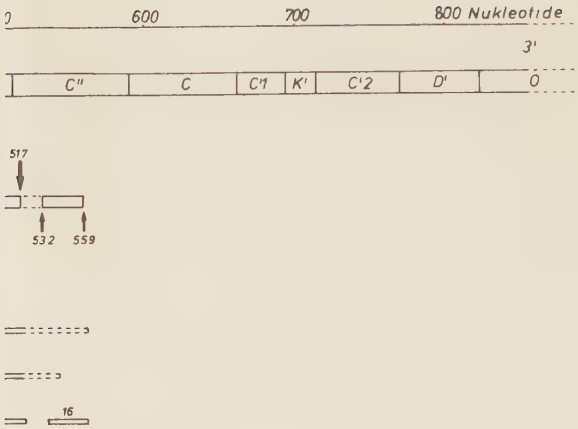


Abbildung 36: Subfragmentzusammensetzung der S4-F1 RNA und RNA-RNA-Wechselwirkungen zwischen einander benachbarten Subfragmenten.

Die miteinander in Wechselwirkung stehenden Subfragmente wurden mit einer Linie verbunden. Die Zahlen an den Linien geben die Molarität des darüber befindlichen Subfragments in dem RNA-Komplex an. Der Fehler beträgt etwa ± 0.2.


0
600
700
800 Nukleotide
3'
C''
C
C'1
K'
C'2
D'
0
517
532
559
16

präsentieren, fehlen und viele kleine Subfragmente weniger häufig als im S4-RNP II vertreten waren. Der Verlust der Subfragmente 18, 18a und 19 führte zu einer großen Lücke von etwa 120 Nukleotiden zwischen den Sektionen Q und B in der S4-F1 RNA.
Die Frage, ob die großen Subfragmente beiderseits der zentralen Lücken (Subfragment 3, 160 Nukleotide, und Subfragment 4, 150 Nukleotide) mit der S4-F1 RNA wandern oder miteinander in Wechselwirkung stehen, wurde durch die Analyse der Subfragmente der Banden S4-F11, 12, 20, 21 und 22 beantwortet.

Die Banden F11/19 (R_F: 0.39), F12/21 (R_F: 0.46) und F22 (R_F: 0.48) waren identisch mit den S4-RNA II Subfragmenten 2, 3 und 5. Die Bande S4-F20 zerfiel unter denaturierenden Bedingungen in die Subfragmente 4, 7, 8 und 9, die aufgrund des R_F-Wertes (0.43), der einer Kettenlänge von maximal 160 Nukleotiden entsprach, nicht alle miteinander in Wechselwirkung stehen konnten. Die Subfragmente 7, 8b und 9 sind "Tochtermoleküle" des Subfragmentes 4 (s. Tab. III), und da sie mit diesem in einer Bande wandern, müssen sie untereinander in Wechselwirkung stehen. Außerdem lagen die Subfragmente 7, 8b und 9 in äquimolaren Mengen in der F20-Bande vor (7 : 8b + 9 = 1.06) (s. auch Abb. 36). Dieser Befund stärkt die Schlußfolgerung, daß die Subfragmente in Wechselwirkung stehen.

Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der großen Subfragmente im 10%igen Polyacrylamidgel schloß also eindeutig aus, daß sie in der S4-F1 RNA nebeneinander wandern. Aufgrund der Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Subfragmente konnte die Gesamtkettenlänge der S4-F1 RNA auf mindestens 360 Nukleotide geschätzt werden. Daraus folgte, daß zusätzlich kleinere Subfragmente in dem Komplex mit den beiden großen Subfragmenten assoziiert sein mußten.
Wenn die Subfragmente beiderseits der zentralen Lücke in der S4-F1 RNA miteinander in spezifische Wechselwirkung treten, dann sollten auch die RNA-Bereiche L-Q und B-C" äquimolar vorliegen, was für die S4-F1 RNA gezeigt werden konnte (s.Tab.IX).

Die geringere elektrophoretische Beweglichkeit der S4-F10 RNA (R_F: 0.3) gegenüber der S4-F20 RNA erklärt sich durch eine wei-

Tabelle IX: Die molaren Anteile der miteinander in Wechselwirkung stehenden RNA-Bereiche (L)-(Q) und B'(C")

	Absolute Häufigkeit der Subfragmente aus der 5'-Hälfte (max. Sektion L - (Q))							
	4	7	8b	9	10a	11a/b	13a	17
S4 RNP II	6.0	9.0	7.0	12.0	5.5	7.0	1.5	6.5
S4-F1	4.5	9.5	7.5	13.0	5.0	13.0	-	5.0
S4-4U1	21.0	-	-	27.0	-	-	3.0	-
R1	15.5	6.0	8.0	13.5	-	9.0	-	-

tere Wechselwirkung des Subfragments 4 bzw. seiner "Tochtersubfragmente" 7, 8b und 9 mit dem Subfragment 11b aus der Sektion L, das sich nach der vorliegenden Sequenz der 16S RNA direkt an das 5'-Ende des Subfragments 4 bzw. seiner Tochtersubfragmente" 8b und 9 anschließt (s. Abb. 36).

In der Bande S4-F7 (identisch mit F15 und F29) waren die Subfragmente 18, 18a und 19 aus den zentralen Sektionen R, G und M anzutreffen. Mit ihnen wanderten die Subfragmente 12, 14/15 und 16. Es ist möglich, daß die Subfragmente 18, 18a und 19 untereinander in Wechselwirkung stehen und aus diesem Grunde mit den größeren Subfragmenten in der Bande F7 wandern können.

absolute Häufigkeit der Subfragmente aus der 3'-Hälfte (max. Sektion B - (C"))									Σ 5'-Hälfte	Σ 3'-Hälfte	Σ 5' / Σ 3'
1	2	3	5	8b	10b	12	13b	16			
4.5	5.0	6.0	4.5	3.5	5.5	5.5	1.5	9.5	54.5	45.5	1.2
4.0	6.5	8.5	2.5	3.5	5.0	1.0	-	11.5	57.5	42.5	1.4
5.0	11.5	14.5	-	-	-	-	3.0	15.0	51(±2.5)	49(±2.5)	1.0
8.0	10.0	13.0	-	4.0	-	1.5	-	11.5	52(±3.5)	48(±7)	1.1

Die zentrale Region (R),(G) und (M), die im S4-RNP nachzuweisen ist, wurde in der Tabelle nicht berücksichtigt.
Um die molaren Ausbeuten an Subfragmenten zu ermitteln, wurde die Häufigkeit eines jeden Subfragments (die Intensität jedes Subfragments auf dem Röntgenfilm) durch die Kettenlänge dividiert. Die Summe der molaren Ausbeuten aller Subfragmente entsprach 100 %. Für die Subfragmentgemische 8a/b und 13a/b waren die molaren Ausbeuten nur für das S4-RNP II bekannt. Für die S4-F1 RNA wurde angenommen, daß diese sich nicht geändert haben. In der S4-F1 RNA und der R1-RNA wurde durch Angabe des Fehlerbereichs die Unsicherheit bezüglich der molaren Verhältnisse zwischen 8a und 8b sowie 13a und 13b berücksichtigt.

4.2.2 Partielle Denaturierung der S4-F1 RNA mit ansteigenden Harnstoffkonzentrationen und Lokalisierung der RNA-RNA Wechselwirkungen

Um schwach gebundene Subfragmente aus der S4-F1 RNA zu entfernen, wurde das Fragment gegen 2, 4 und 6 molare Harnstofflösungen dialysiert und anschließend unter den gleichen Pufferbedingungen in 10%igen Polyacrylamidgel-Platten fraktioniert (s. Abb. 37). Die Gelzonen mit den RNA-Dissoziationsprodukten wurden aus der Polyacrylamidgel-Platte ausgeschnitten und unter denaturierenden Bedingungen in kombinierten 12- und 15%igen Polyacrylamidgel-Platten auf ihre Subfragment-Zusammensetzung hin untersucht.

Die Dialyse der S4-F1 RNA gegen 2 molaren Harnstoff bei Raumtemperatur führte zu 6 Banden im Polyacrylamidgel, die mit S4-2U1, 2U2 ... 2U6 bezeichnet wurden. Die S4-2U1 RNA (R_F: 0.054) besaß die größte Intensität (s. Abb. 37a).
Die Subfragmentanalyse ergab, daß bis auf die Subfragmente 17 und 14/15 alle Subfragmente der S4-F1 RNA auch in der S4-2U1 RNA nachweisbar waren (s. Tab. X).
Die S4-2U2 und 2U3 RNA unterschieden sich in ihrer Subfragment-Zusammensetzung nicht von der S4-F10 und F20 RNA (s.Abschn. 4.2.1). Die S4-2U4 RNA setzte sich aus einem Gemisch der Subfragmente 4 und 5 zusammen, die zusammen in einer Bande wanderten.
In der Bande 2U5 wanderten die Subfragmente 10 und 11 und in der Bande 2U6 die Subfragmente 16 und 17.

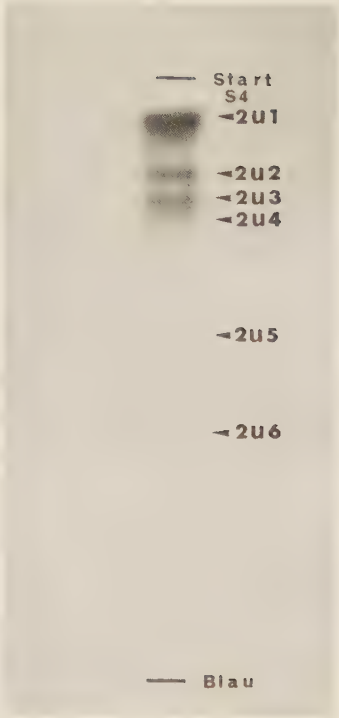
Die Dialyse der S4-F1 RNA gegen 4 M Harnstoff führte zu acht RNA-Dissoziationsprodukten, die im 10%igen Polyacrylamidgel

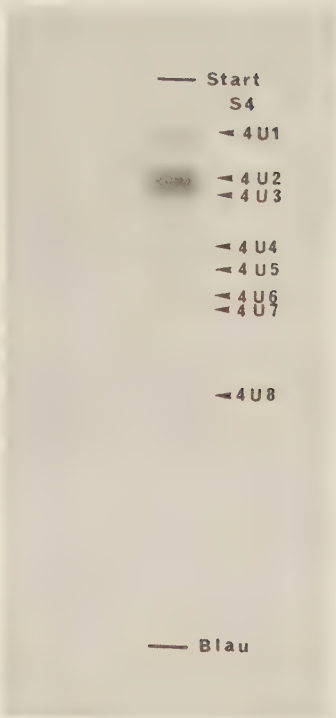
---

Abbildung 37: Autoradiogramm von Dissoziationsprodukten der S4-F1 RNA.

Die S4-F1 RNA wurde gegen 2, 4 und 6 M Harnstoff in 0.008 M Tris-Acetat, pH 8.0, und 0.001 M Mg-Acetat dialysiert und anschließend in einem 10%igen Polyacrylamidgel, das mit dem entsprechenden Dialysepuffer äquilibriert worden war, elektrophoretisch fraktioniert (s. "Methoden": 3.8).

a) 2 M Harnstoff
b) 4 M Harnstoff
c) 6 M Harnstoff





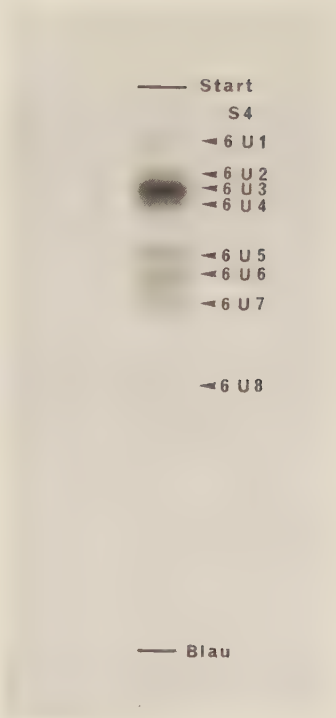


Abbildung 37: a b c

elektrophoretisch fraktioniert wurden. Das Fragment mit der geringsten elektrophoretischen Beweglichkeit, S4-4U1 (R_F: 0.096), enthielt nur noch die Subfragmente 1, 2, 3, 4 und 9 in hohen Ausbeuten (s. auch Blockdiagramm in Abb. 40).
Das Subfragment 9 (Sektion H" und (H)) war das einzige "Tochtersubfragment" von der 5'-Hälfte der S4-F1 RNA, das in der S4-4U1 RNA nachzuweisen war, und es muß demnach mit Subfragmenten jenseits der zentralen Lücke in Wechselwirkung stehen. Das Subfragment 8b, das sich nur in einer Sequenzheterogenität von dem Subfragment 9 unterscheidet, war dagegen nur in submolaren Mengen nachweisbar.
In der 3'-Hälfte der S4-4U1 fehlte unter anderem das Subfragment 5 (B, I' und I), während die Subfragmente 1, 2, 3 und 16 in höheren Ausbeuten nachzuweisen waren.
Daraus konnte geschlossen werden, daß eine RNA-RNA Fernwechselwirkung innerhalb des Bindungsbereichs von S4 zwischen den Sektionen H"-H einerseits und I"-C" andererseits erfolgte.

Die Lücke von 15 Nukleotiden in der Sektion C" könnte auf zwei voneinander unabhängige Bindungsorte des Subfragments 9 in dem Sequenzbereich I"-C" hinweisen. Andererseits ist es nicht auszuschließen, daß das Subfragment 16 (aus Sektion C") mit dem ihm benachbarten Subfragment 2 oder 3 (aus den Sektionen B-C") in Wechselwirkung steht und keinen direkten Kontakt mit dem Subfragment 9 hat.

Der Subfragmentgehalt der S4-4U2 RNA entspricht dem der S4-2U3 RNA,und die S4-4U3 RNA war identisch mit dem Subfragment 5. Die in niedrigen Ausbeuten nachzuweisenden Subfragmente 8 und 9 stellten Verunreinigungen aus der im Polyacrylamidgel be-

---

Abbildung 38: Referenzgelsystem zur Analyse der Subfragmentzusammensetzung von Dissoziationsprodukten der S4-F1 RNA (s. auch Legende zur Abb. 35).

Abbildung 39: Autoradiogramm der rekonstituierten S4-F1 RNA.

A) Rekonstitutionsgemisch nach elektrophoretischer Fraktionierung in einem 10%igen Polyacrylamidgel, das 0.01 M Tris-Acetat, pH 8.0, und 0.005 M Mg-Acetat enthielt.
B) Autoradiogramm der Subfragmente der Bande I
C) Autoradiogramm der Subfragmente der Bande II

O = Start

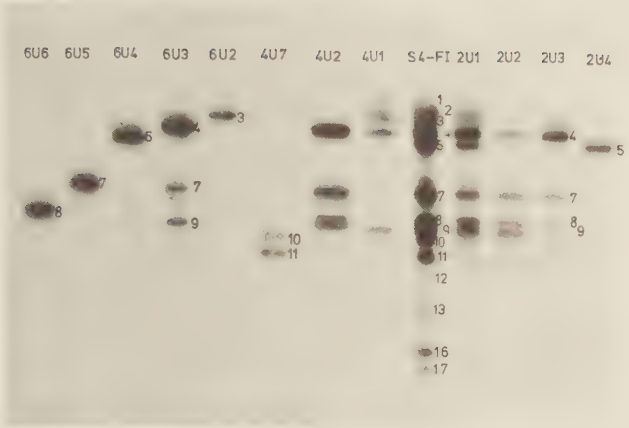


Abbildung 38:

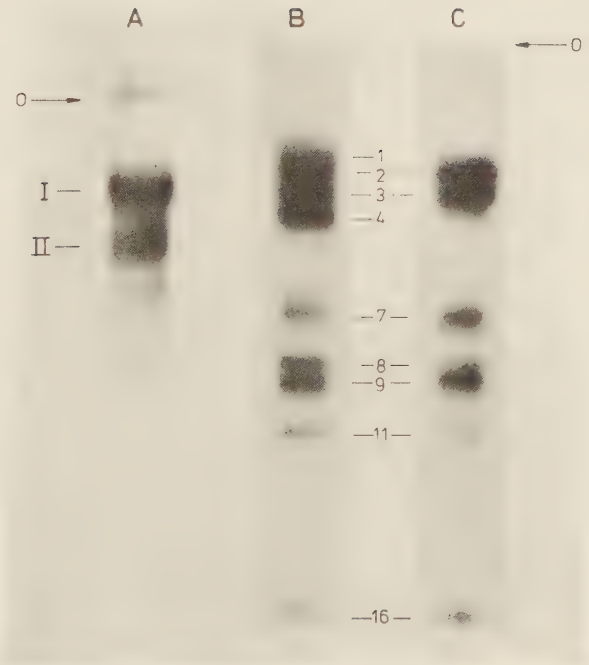


Abbildung 39:

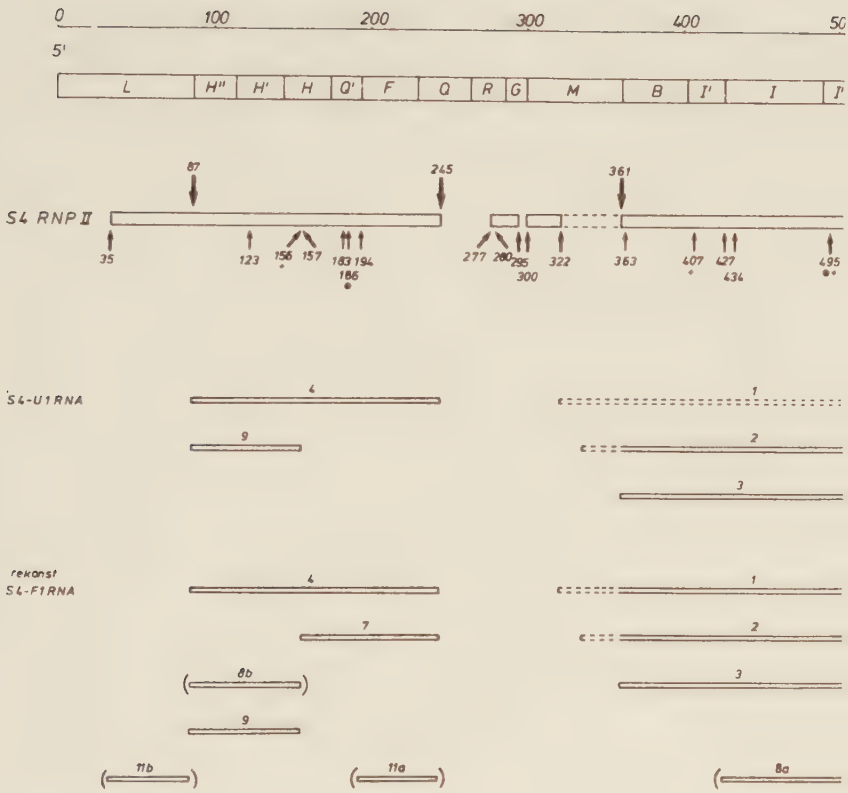
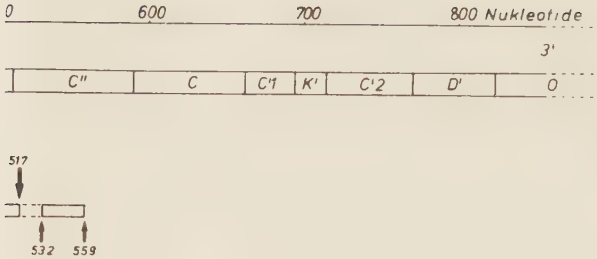


Abbildung 40: Subfragmentzusammensetzung der S4-U1 RNA und der rekonstituierten S4-F1 (R1) RNA

Weil die Subfragmente 8a und 8b bzw. 11a und 11b zusammen in jeweils einer Bande wandern, konnte bisher nicht geklärt werden, welche von ihnen in der R1-RNA vertreten sind. Aus diesem Grunde wurden alle vier Subfragmente in der Abbildung eingeklammert.


0
600
700
800 Nukleotide
3'
C''
C
C'1
K'
C'2
D'
0
517
532
559

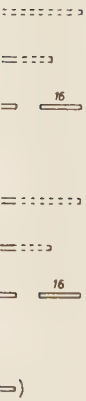

16
16

Tabelle X: Subfragment-Zusammensetzung der S4-F1, S4-2U1, S4-4U1 und R1 RNA.

S4 RNA II Subfragmente	relative Häufigkeit der Subfragmente in % S4-F1	S4-2U1	S4-4U1	R1
1	1,3	2,9	7,3	13,4
2	4,8	7,7	17,1	16,7
3	7,3	8,1	18,8	19,5
4	17,0	18,2	25,3	22,4
5	13,3	13,1	0	0
7	13,5	11,7	0	5,7
8	11,4	13,4	3,3	7,3
9	12,0	13,1	15,5	7,8
10	6,3	3,9	0	4,1
11	6,5	3,9	6,0	4,1
12	0,5	0,6	0	0
13	1,0	1,0	2,7	0
14/15	0,4	0	0	0
16	3,1	2,6	4,1	3,3
17	1,7	0	0	0

Die Ausbeuten an großen Subfragmenten lagen in der S4-F1 RNA niedrig, weil das S4-RNP II in Gegenwart hoher Enzymkonzentrationen präpariert worden war.

nachbarten Bande S4-4U2 dar.

Nach der Dialyse der S4-F1 RNA gegen 6 molaren Harnstoff war die S4-6U1 RNA (R_F: 0.096), die aufgrund ihrer Wanderung der S4-4U1 RNA äquivalent ist, kaum noch nachzuweisen. Die übrigen im Gel aufgetrennten Banden waren bis auf S4-6U3 mit einzelnen Subfragmenten der S4-RNA II identisch. In der Bande S4-6U3 wanderte das Subfragment 4 zusammen mit seinen untereinander in Wechselwirkung stehenden "Tochtersubfragmenten" 7 und 9. Aus diesem Resultat kann geschlossen werden, daß die RNA-RNA Wechselwirkung zwischen den Subfragmenten 7 und 9 ((H) Q' F (Q) und H" H' H) die stärkste innerhalb der S4-RNA II ist.

4.2.3 Rekonstitution der S4-F1 RNA

Ob die spezifischen RNA-RNA Wechselwirkungen innerhalb der S4-F1 RNA auch die Rekonstitution der intakten S4-F1 RNA aus einem Gemisch ihrer Subfragmente ermöglichen, wurde in dem folgenden Experiment geprüft:

Die S4-F1 RNA wurde zunächst gegen 0.0025 molares EDTA und 8 molaren Harnstoff dialysiert und auf 60°C erwärmt. Anschließend wurde sie gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in Rekonstitutionspuffer aufgenommen und zunächst auf 60°C erwärmt und danach auf 0°C abgekühlt. Das Rekonstitutionsgemisch wurde dann in einem 10%igen Polyacrylamidgel in Gegenwart von Mg^{2+} elektrophoretisch fraktioniert.

75 % der in das Rekonstitutions-Experiment eingesetzten RNA befanden sich in den Banden R1 und R2 (s. Banden I und II in Abb. 39). Die R1 RNA, die die geringste elektrophoretische Mobilität besaß (sie entsprach der Wanderung der intakten S4-F1 RNA unter identischen Elektrophoresebedingungen), enthielt die Subfragmente 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11 und 16. Die Bande R2 enthielt die Subfragmente 2, 3, 7, 9, 11 und 16.
Aus der Tabelle X ist ersichtlich, daß in die R1-RNA bevorzugt große Subfragmente inkorporiert wurden.
Die Subfragmente aus den Sektionen L-Q aus der 5'-Hälfte der S4-F1 RNA II und die Subfragmente aus der 3'-Hälfte lagen in der R1 RNA in äquimolaren Mengen vor (s. Tab. IX).

Inkubation der R1-RNA mit frischem S4 erhöhte ihre Retention auf Nitrocellulosefiltern von 5 auf 25 %, dagegen erhöhte sich die Retention nur unwesentlich um 1 bzw. 3 %, wenn die R1-RNA mit den Proteinen S8 bzw. L24 inkubiert worden war. Dieses Ergebnis zeigte, daß die R1-RNA den intakten Bindungsort von S4 enthielt.

Die Rekonstitution der denaturierten S4-F1 RNA in Gegenwart von S4 führte zu dem gleichen Resultat, woraus geschlossen werden konnte, daß S4 keinen Einfluß auf die Zusammenlagerung der Subfragmente zur R1-RNA hatte (s. auch Resultate von Teil I).

4.2.4 Analyse großer RNA-Fragmente, die aus dem Hydrolysat vorinkubierter 16S und 23S RNA isoliert wurden

Nach enzymatischer Hydrolyse von proteinfreier 16S und 23S RNA mit T_1-RNase konnten zwei große RNA-Fragmente (KI, R_F: 0.098 und KII, R_F: 0.11) aus dem Hydrolysat isoliert werden (s. Abb. 10). Die K I RNA wurde mit Hilfe der Fingerprinttechnik analysiert, und die K II RNA wurde auf ihren Subfragmentgehalt hin untersucht.
Die Abbildung 41 zeigt ein Autoradiogramm von der Oligonukleotidkarte der K I RNA. Alle charakteristischen Oligonukleotide der S4 RNA I waren auf der Oligonukleotidkarte der K I RNA eindeutig nachweisbar (vgl. Abb. 13 mit Abb. 41).
Die Oligonukleotide 42, 45 und 49 aus den Sektionen D' und O, die über 200 Nukleotide von der Sektion C" entfernt sind, waren ebenfalls Bestandteile der K I RNA.
Daraus konnte geschlossen werden, daß Teile dieser RNA-Sektionen mit Bereichen aus den Sektionen L-C" in Wechselwirkung stehen müssen (RNA-RNA Wechselwirkungen).

Das Subfragmentmuster der K II RNA wurde mit dem des S4-RNP II verglichen, das unter identischen Hydrolysebedingungen präpariert worden war wie die K II RNA (s. Abb. 42). Die beiden Subfragmentmuster waren einander sehr ähnlich, und Unterschiede betrafen vorwiegend die Intensitäten der Banden. In der K II RNA traten nur zwei neue Subfragmente auf, die mit x und y benannt wurden.
In dem Blockdiagramm in der Abbildung 15 sind mit einem ● die Enzymschnitte gekennzeichnet, die in Abwesenheit von S4 häufiger auftraten.

Diese Ergebnisse zeigten, daß das Protein S4 bis auf zwei Ausnahmen (Positionen 186 und 495) Enzymschnitte nicht vollständig verhindern kann, sondern nur die Zugänglichkeit des Enzyms zum Substrat behinderte.

Die Subfragmente 18, 18a und 19 aus den Sektionen R, G und M waren sowohl in der K I RNA als auch in der K II RNA nachzuweisen, woraus geschlossen wurde, daß die Subfragmente aus diesen zentralen Regionen der Fragmente mit anderen Bereichen aus der K I bzw. K II RNA in Wechselwirkung stehen. Diese RNA-RNA

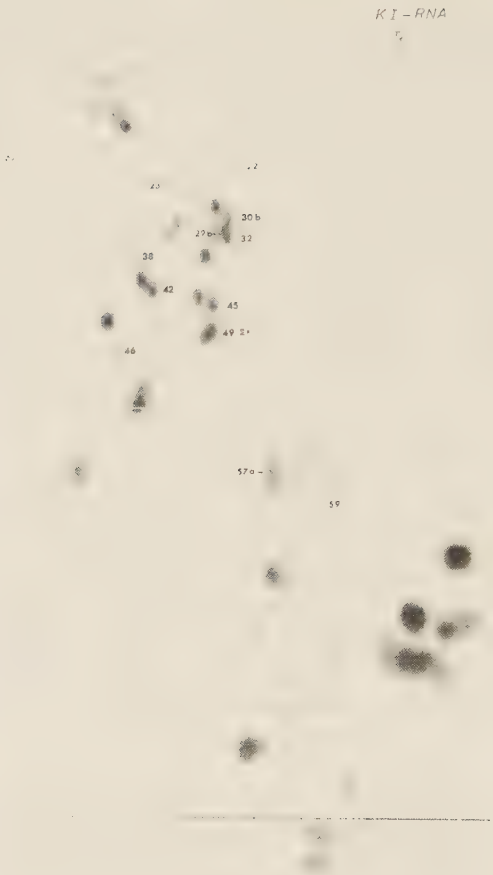


Abbildung 41: T_1-Oligonukleotidkarte der K I-RNA.

Nur die charakteristischen Oligonukleotide aus den geschützten RNA Sektionen sind beschriftet. Die Sequenzen der numerierten Flecken sind der Tabelle II zu entnehmen.

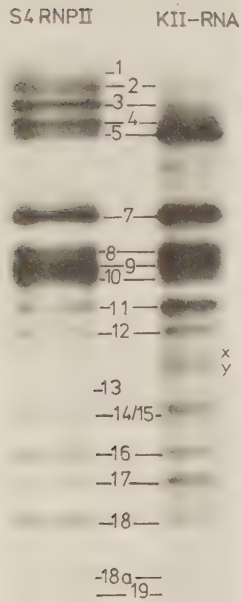


Abbildung 42: Autoradiogramm von den Subfragmenten des S4 RNP II und der K II RNA

Wechselwirkungen scheinen aber vergleichsweise schwach zu sein, weil nach schonender Deproteinisierung des S4-RNP II die Subfragmente 18, 18a und 19 in der S4-F1 RNA nicht mehr nachzuweisen waren.

4.2.5 Deproteinisierung des S4-S20-RNPs I

^{32}P markierte S4-S20-RNPs I wurden mit der Natriumlaurylsulfat-Methode deproteinisiert. Die dissoziierten Proteine wurden elektrophoretisch von der RNA abgetrennt und letztere in 10%igen Polyacrylamidgel-Platten fraktioniert. Aliquote der S4-S20-RNA I wurden vor der Elektrophorese kurzfristig von 20°C auf 40°C oder 50°C erwärmt. Die S4-S20-F1 RNA (R_F: 0.07), die nach der Deproteinisierung der S4-S20-RNPs I isoliert werden konnte, enthielt die gesamte S4-S20-RNA I (s. Abb. 44). Nur die Subfragmente aus den zentralen Sektionen K, G und M sowie die aus der peripheren Sektion L lagen in geringeren Ausbeuten vor als in der S4-S20-RNA I.
Aus der Tabelle XI sind die Häufigkeiten der einzelnen Subfragmente zu entnehmen.

Nach Erwärmung auf 40°C war die S4-S20-F1-RNA kaum noch und nach Erwärmung auf 50°C überhaupt nicht mehr nachzuweisen. Die großen Subfragmente 1, 2 und 3, die in der F1-RNA miteinander in Wechselwirkung standen, wanderten allein in den Banden 11 (16), 17 und 18 (s. Abb. 43). Ihre R_F-werte lagen zwischen 0.37 und 0.48.

Die verschiedenen RNA-RNA Wechselwirkungen, an denen das Subfragment 3 beteiligt ist, lassen sich anhand der F18 (Subfragment 3), F15 (10), F8 und F3 RNA demonstrieren. Die F15 (10) RNA (R_F: 0.3) enthielt die Subfragmente 3 und 5 bzw. 3, 5 und 6. Die Subfragmente 5 und 6 unterschieden sich lediglich in einer Sequenzheterogenität, die in der Sektion H" auftritt, voneinander. Der R_F-Wert des Subfragments 6 (Bande F18) betrug in dem gleichen Gelsystem 0.76. Daraus folgte, daß in der F10 (15) RNA die Subfragmente 3 und 5 bzw. 6 miteinander in Wechselwirkung stehen. Das molare Verhältnis der Subfrag-

---

Abbildung 43: Autoradiogramm der deproteinisierten S4-S20-RNA I
(Erläuterungen s. Legende zur Abb. 34)

Abbildung 44: Referenzgelsystem zur Analyse der Subfragmentzusammensetzung verschiedener Dissoziationsprodukte der S4-S20-RNA I (s. auch Legende zur Abb. 35).

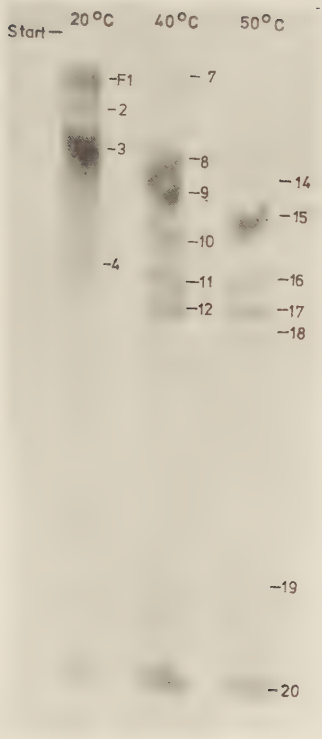


Abbildung 43:

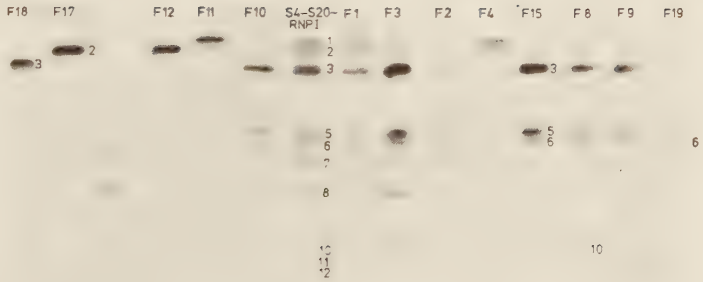


Abbildung 44:

Tabelle XI: Subfragment-Zusammensetzung der S4-S20-RNPs I und S4-S20-F1-RNA

S4-S20 RNA I Subfragmente	relative Häufigkeit der Subfragmente in % S4-S20-RNA I	S4-S20-F1
1	10,3	21,2
2	10,3	13,3
3	28,0	33,2
4	1,7	3,1
5	12,3	9,3
6	12,2	12,8
7	9,6	5,3
8	1,4	0
9	1,4	0
10	4,7	0
11	5,7	1,8
12	2,5	0

mente zueinander betrug 1,1.

Die F8 RNA (R_F: 0.25) enthielt zusätzlich zu den Subfragmenten 3 und 5 (6) das Subfragment 10 aus der Sektion L in äquimolaren Mengen. Diese weitere Wechselwirkung war für den kleineren R_F-Wert von F8 gegenüber F15 verantwortlich. Die Subfragmente 3, 5 (6) und 10 standen im molaren Verhältnis von 1 : 1.1 : 0.96 zueinander.

In der F3 RNA (R_F: 0.25) trat zu den Subfragmenten der F8 RNA das Subfragment 8 aus der Sektion M hinzu.
Alle vier Subfragmente standen in einem molaren Verhältnis von 1 : 1.2 : 0.84 : 0.81 zueinander.

Die Wechselwirkung zwischen den Subfragmenten 3 und 5 war die stärkste; danach folgte die zwischen 3, 5 (6) und 10 sowie zwischen 3, 5 (6), 10 und 8, da mit ansteigender Temperatur zunächst das Subfragment aus Sektion M und dann das aus Sektion L dissoziierte.

In dem Blockdiagramm in Abbildung 45 wurden alle nachgewiese-

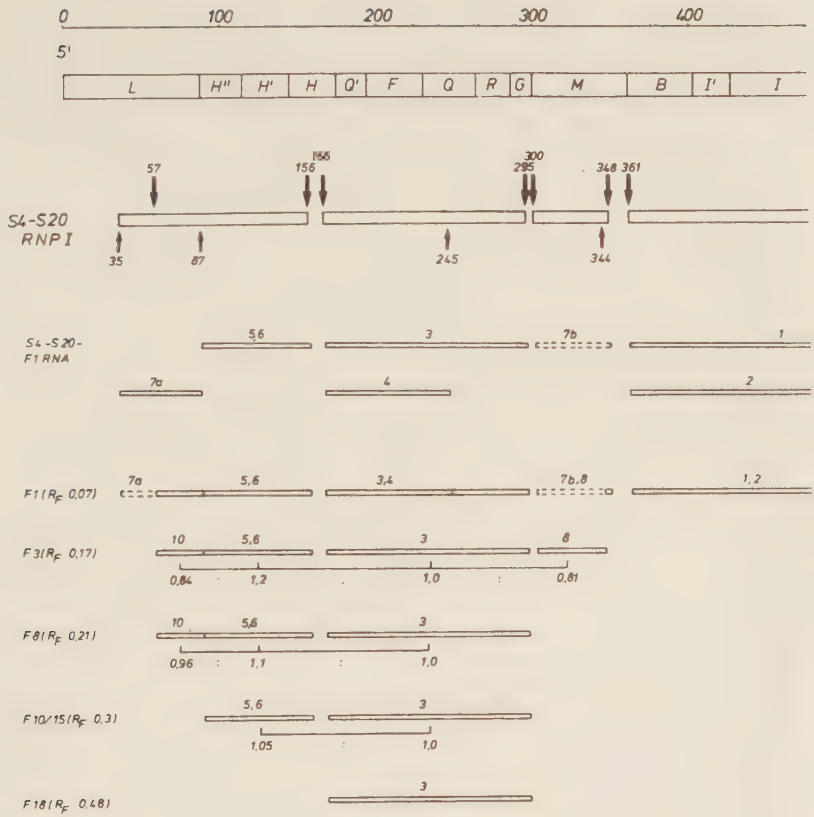
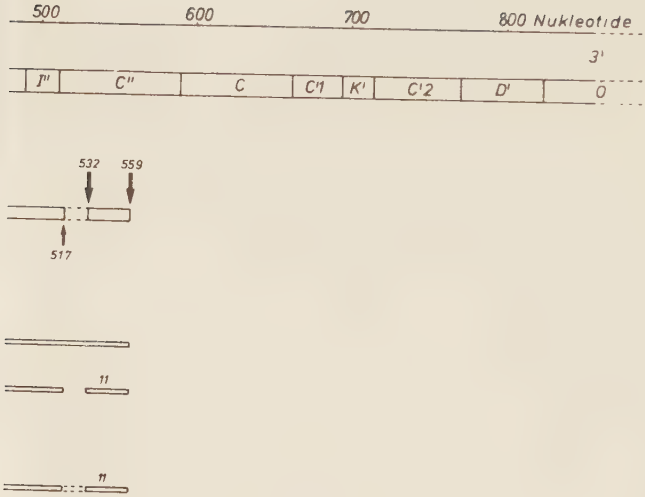


Abbildung 45: Subfragment-Zusammensetzung der S4-S20-F1-RNA und RNA-RNA Wechselwirkungen zwischen einander benachbarten Subfragmenten (Erläuterungen s. auch Legende zur Abb. 36).


500
600
700
800 Nukleotide
3'
I''
C''
C
C'1
K'
C'2
D'
O
532
559
517
11
11

nen RNA-RNA Wechselwirkungen innerhalb des Bindungsbereichs von S4 und S20 auf der 16S RNA schematisch zusammengefaßt.

4.2.6 Deproteinisierung des S4-S20-RNPs II (= S20-RNP)

Das S20-RNP wurde mit der Natriumlaurylsulfat-Methode deproteinisiert. Vor der Elektrophorese der S20 RNA in einem 12%igen Polyacrylamidgel wurde ein Aliquot der Probe kurzfristig auf 40°C erwärmt.

Die S20-F1-RNA (R_F: 0.19) enthielt den gesamten Bindungsbereich von S20 auf der 16S RNA in nahezu äquimolaren Mengen: (L) : H" H' H (α') : (F) α R (G) : (M) = 1 : 1 : 0.99 : 0.8. Die Häufigkeiten der Subfragmente aus der F1 RNA sind der Tabelle XII zu entnehmen.
Die F3 (7) RNA enthielt bis auf das fehlende Subfragment 7 die gleiche Zusammensetzung an Subfragmenten wie die F2-RNA. Die relativen Häufigkeiten wichen aber von denen in der F2-RNA ab. Die nachgewiesenen Wechselwirkungen in dem Bindungsort von S20 sind aus dem Blockdiagramm in Abbildung 48 ersichtlich.

Abbildung 46: Autoradiogramm der deproteinisierten S4-S20-RNA II (S20-RNA)

Nach der Dialyse gegen Natriumlaurylsulfat und Erwärmung der Proben auf 40°C wurden die RNA-Dissoziationsprodukte in einer 12%igen Polyacrylamidgel-Platte elektrophoretisch fraktioniert (s. auch Legende zur Abb. 34).

Abbildung 47: Referenzgelsystem zur Analyse der Subfragment-Zusammensetzung verschiedener Dissoziationsprodukte der S20-RNA (s. auch Legende zur Abb. 35).

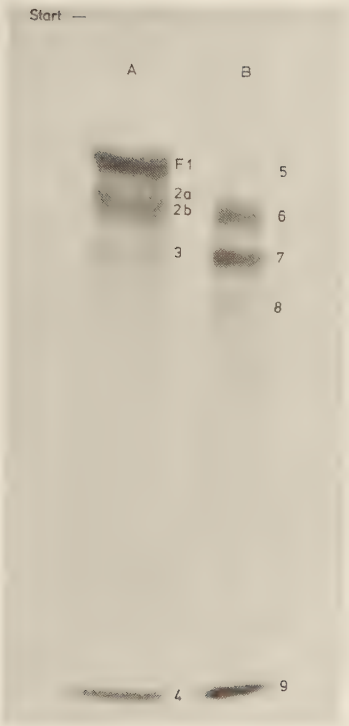


Abbildung 46:

Abbildung 47:

Tabelle XII: Subfragment-Zusammensetzung der S20-RNA (S4-S20-RNA II) und der S20-F1-RNA.

S4-S20 RNA II (= S20 RNA) Subfragmente	relative Häufigkeit der Subfragmente in % S20-RNA	S20-F1
1	18,0	33,0
2	13,2	17,8
3	14,4	22,2
4	8,4	1,6
5	11,2	10,8
6	9,6	4,3
7	9,0	3,8
8	10,7	6,5
9	4,8	0

Abbildung 48: Subfragment-Zusammensetzung der S20-F1-RNA und RNA-RNA Wechselwirkungen zwischen einander benachbarten Subfragmenten (Erläuterungen s. Legende zur Abb. 36).

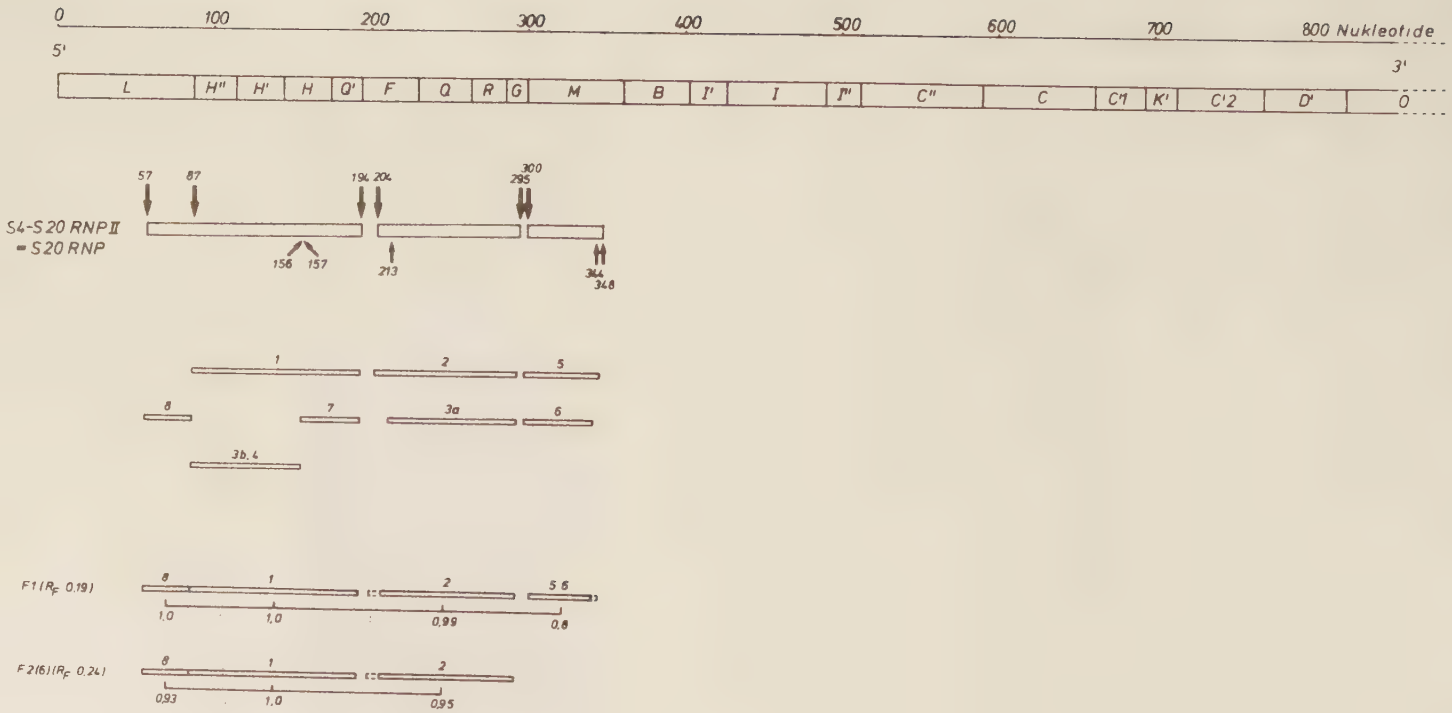


Abbildung 48:

4.3 Hydrolyseuntersuchungen mit trägergebundener RNase A

4.3.1 Der Bindungsort von S4 auf der 16S RNA

444 µg [^{32}P] 16S und 23S RNA wurden nach Vorinkubation in TMK-Puffer mit 0.22 mg RNase A, die an einen Träger gekoppelt war, 5 Stunden lang bei 21°C hydrolysiert. Unter identischen Bedingungen wurden rekonstituierte S4-16S RNA Komplexe mit trägergebundener RNase A inkubiert.
In den Taschen a und d der 5%igen Polyacrylamidgel-Platte (s. Abb. 43) wurden die Hydrolysate der proteinfreien 16S und 23S RNA und die der S4-16S RNA-Komplexe aufgetragen und elektrophoretisch fraktioniert. In dem Hydrolysat der proteinfreien RNA konnte ein großes RNA-Fragment nachgewiesen werden, das die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit besaß wie das RNA-Fragment, das im Hydrolysat renaturierter 16S RNA nachgewiesen wurde und den Bindungsort von S4 enthielt (siehe Teil I).

Aus dem Hydrolysat der S4-16S RNA-Komplexe konnte ein spezifisches S4-RNP (S4-RNP$_{panc.}$) isoliert werden, das einen R_F-Wert von 0.33 aufwies (s. dazu auch Teil I: 4.3).

Abbildung 49: Autoradiogramm von den fraktionierten RNase A Hydrolysaten von proteinfreier 16S + 23S RNA, S4-16S RNA-Komplexen, S4-S20-16S RNA-Komplexen und S20-16S RNA-Komplexen + 23S RNA.

Proteinfreie 16S + 23S RNA und verschiedene spezifische Protein-16S RNA Komplexe wurden unter gleichen Bedingungen mit trägergebundener RNase A hydrolisiert und anschließend in 5%igen Polyacrylamidgel-Platten, die 0.02 M Tris-Acetat, pH 8.0, und 0.005 M Mg-Acetat enthielten, elektrophoretisch fraktioniert. Die Pfeile deuten auf die geschützte RNA bzw. RNPs.

a) S4-RNA$_{panc.}$
b) S20-RNP
c) S4-S20 RNP I und II
d) S4-RNP

Abbildung 50: Autoradiogramm von den elektrophoretisch fraktionierten Subfragmenten der S4-RNA$_{panc.}$ und S4-RNP$_{panc.}$ (s. Legende zur Abb. 11).

Die Sequenzen verschiedener Subfragmente sind der Tabelle XIII und der Abbildung 53 zu entnehmen.

Abbildung 49:

Abbildung 50:

Die Gelstücke mit dem RNA-Fragment und dem S4-$RNP_{panc.}$ wurden aus der Polyacrylamidgel-Platte ausgeschnitten, und ein Teil des RNA-Fragments und des RNPs wurde aus dem Gel eluiert und mit Hilfe der Fingerprint-Technik analysiert. Der Rest der RNA und RNPs wurde unter denaturierenden Bedingungen in kombinierten 12- und 15%igen Polyacrylamidgelen auf ihren Subfragmentgehalt hin untersucht.

Die Oligonukleotidkarten von dem RNA-Fragment und der RNA des S4-$RNPs_{panc.}$ unterschieden sich nicht voneinander (siehe Abb. 51 a/b), woraus geschlossen werden konnte, daß beide Fragmente identisch waren. Die Subfragmentmuster der beiden Fragmente waren einander ebenfalls sehr ähnlich (s.Abb.50).

Die Kettenlänge des RNA-Fragments (S4-$RNA_{panc.}$) bzw. der RNA des S4-$RNPs_{panc.}$ betrug 429 Nukleotide.

Die unterschiedliche Wanderung der S4-$RNA_{panc.}$ gegenüber dem S4-$RNP_{panc.}$ beruht wahrscheinlich auf dem niedrigeren Molekulargewicht und einer anderen Oberflächenladung der S4-$RNA_{panc.}$

Abbildung 51: Autoradiogramme der T_1-Oligonukleotidkarten von der S4-$RNA_{panc.}$ (a) und der RNA des S4-$RNP_{panc.}$ (b). Die Sequenzen der numerierten Oligonukleotide sind der Tabelle II zu entnehmen.

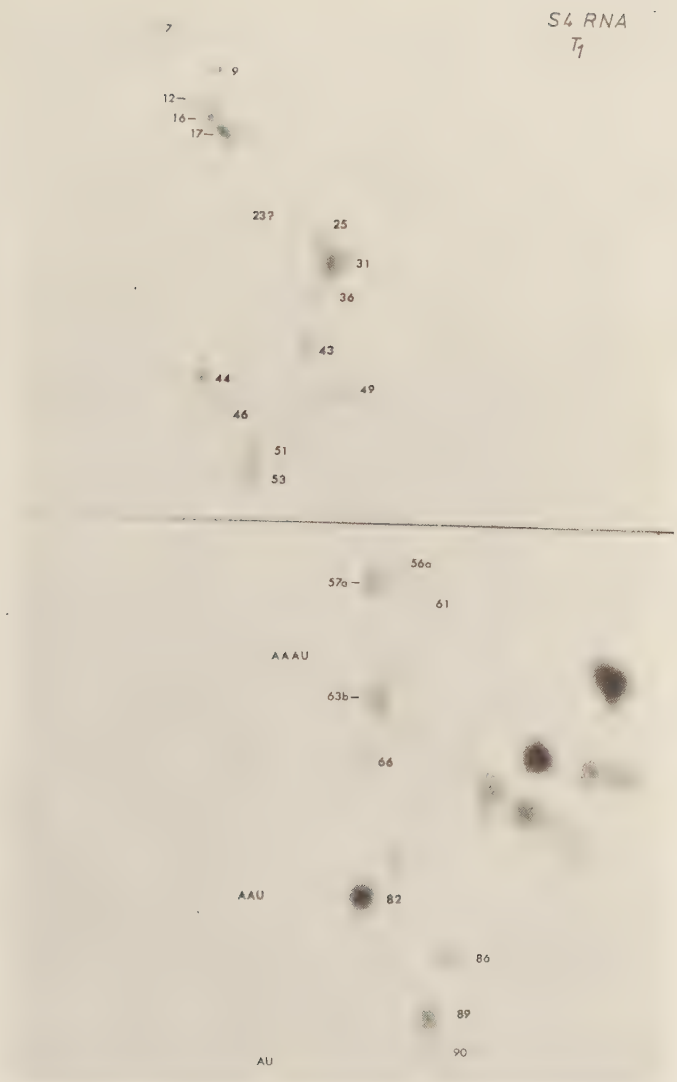


Abbildung 51 a:

Abbildung 51b:

Tabelle XIII: Sequenzen und Kettenlänge der Subfragmente der S4-$RNA_{panc.}$ (Erläuterungen s. Tab.III).

S4-$RNA_{panc.}$ Subfragmente		16S RNA-Sektionen		Kettenlänge in Nukleotiden
a		M B I' I" (C")		~225
b		H" H' H Q' (F)		~127
c	1)	H" H' H (Q')		~97
	2)	(I') I I"		
d	1)	(H') H Q' (F)		~93
	2)	I (I")	(unsicher)	
e	1)	(H') H (Q')		~70
	2)	I		
	3)	M		
	4)	(L) (H")		
f	1)	(B) I'		~59
	2)	(I') (I)		
h		(G) (M)		44
i		(M)	(unsicher)	
j_1		(F) (Q)		32
j_2		(L)		30
l_1		(L)		22
l_2	1)	(Q') (F)		22
	2)	(L)		
m_1		(G) (M)		21
m_2		I"		21
n		(R) (G)		15

Die S4-RNA$_{panc.}$ bzw. die RNA des S4-RNP$_{panc.}$ wiesen einige Unterschiede gegenüber der mit dem Enzym T_1 präparierten S4-RNA II (s. 4.1.1) auf:

Die gesamte Sektion M war in der S4-RNA$_{panc.}$ enthalten, während die Oligonukleotide 27, 32 und 111 aus der Sektion C" nicht eindeutig nachweisbar waren.

Die unterschiedliche Substratspezifität und Größe der trägergebundenen RNase A gegenüber dem Enzym T_1 können als Ursache dafür angesehen werden.

Um die Positionen der Enzymschnitte in der S4-RNA$_{panc.}$ zu lokalisieren, wurde begonnen, die Sequenzen der Subfragmente zu bestimmen. In der Tabelle XIII, dem Blockdiagramm in Abbildung 52 sowie in der Abbildung 53 sind die bisher erzielten Ergebnisse über die Lage einiger S4-RNA-Subfragmente innerhalb der 16S RNA und die Positionen der Enzymschnitte zusammengefaßt worden.

Abbildung 52: Subfragment-Zusammensetzung der S4-RNA$_{panc.}$.

Die Oligonukleotide aus den unterbrochen gezeichneten RNA-Bereichen wurden nur in geringen Ausbeuten in der S4-RNA$_{panc.}$ nachgewiesen. Offene Blöcke geben an, daß Anfang oder Ende eines Subfragments nicht eindeutig bestimmt werden konnten. Nukleotidzahlen in Klammern sind noch nicht gesichert, weil die Enzymschnitte in RNA-Bereichen liegen, die noch nicht vollständig sequenziert sind.

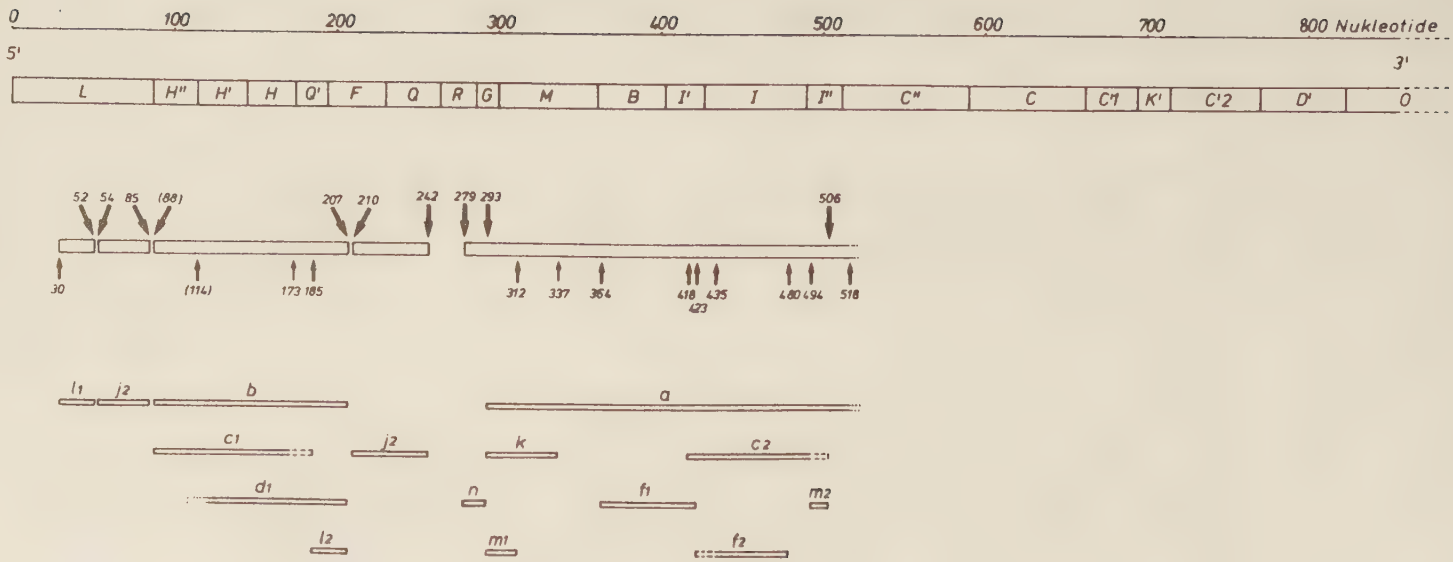


Abbildung 52:

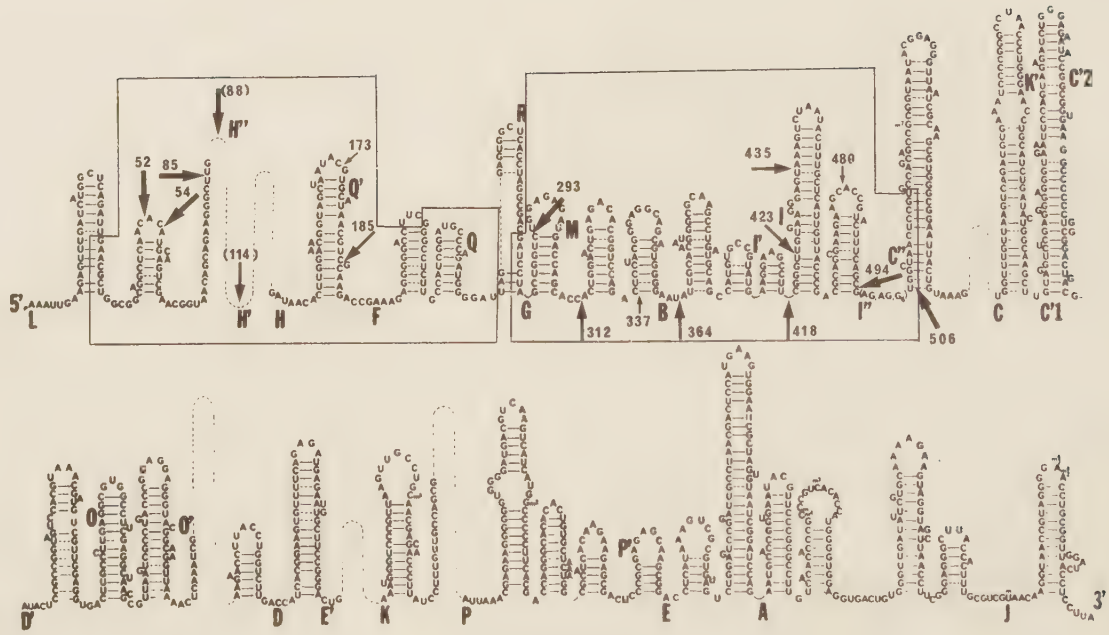


Abbildung 53: Primär- und hypothetische Sekundärstruktur der S4-RNA$_{panc.}$ (s. auch Legende zur Abb. 27).

4.3.2 Hydrolyse der RNA spezifischer S20-16S RNA und S4-S20-16S RNA-Komplexe

Je 444 µg [^{32}P] 16S und 23S RNA wurden mit dem Protein S20 und den Proteinen S20 und S4 in TMK-Puffer inkubiert. Die RNA wurde mit 0.22 mg trägergebundener RNase A hydrolysiert, und die Hydrolysate wurden anschließend in einer 5%igen Polyacrylamidgel-Platte elektrophoretisch fraktioniert (siehe Autoradiogramm in Abb. 49).

Vergleicht man die fraktionierten Hydrolysate der proteinfreien 16S und 23S RNA mit denen der binären und ternären Protein-RNA Komplexe, dann ist zu erkennen, daß die verschiedenen Proteine einen sehr unterschiedlichen Einfluß auf den Verlauf der unter gleichen Bedingungen durchgeführten enzymatischen Hydrolyse hatten. Im Hydrolysat der S20-16S RNA Komplexe war die in Abwesenheit von S20 resistente S4-RNA$_{panc.}$ nicht nachzuweisen, stattdessen aber ein kleineres spezifisches S20 RNP$_{panc.}$ (R_F: 0.44). Erwartet wurde jedoch ein S20 RNP, das zusätzlich zu den von S20 geschützten RNA-Bereichen die Sektionen B-C" enthält.

Wurde der S4-S20-16S RNA Komplex unter den gleichen Bedingungen mit RNase A inkubiert, dann konnten zwei RNPs mit den R_F-Werten 0.32 und 0.44 aus dem Hydrolysat isoliert werden (s. Abb. 49).

Dieses Resultat ist mit den Ergebnissen der Hydrolysen von S4-S20-16S RNA Komplexen mit T_1 RNase vergleichbar (siehe Abschn. 4.1.2).

Das größere RNP enthält wahrscheinlich den Bindungsort von S4 und S20, während das kleinere RNP mit dem S20 RNP$_{panc.}$ identisch ist (die Autoradiogramme der Subfragmentmuster sind nicht abgebildet).

4.4 Methoden zur quantitativen Isolierung des Bindungsortes von S4 auf der 16S RNA

Um die Struktur des Bindungsbereichs von S4 auf der 16S RNA mit physikalisch-chemischen Methoden untersuchen zu können, war es notwendig, homogene S4-RNA oder RNPs in größeren Mengen (1 - 5 mg) rein darzustellen.
Zu diesem Zweck mußten zunächst Hydrolysebedingungen gefunden werden, unter denen nur ein Fragment und nicht eine Serie unterschiedlich großer Fragmente produziert wurde. Außerdem sollte trotz hoher Ausbeuten an spezifischer S4-RNA der Unterschied zwischen dem Molekulargewicht des Fragments und der restlichen verdauten RNA groß sein, um die Isolierung des spezifischen Fragments zu erleichtern.
Die sich nach der Hydrolyse anschließenden Fraktionierungs-Methoden mußten gewährleisten, daß das spezifische Fragment während der Isolierung weder aggregierte noch in seine Subfragmente dissoziierte.

In Vorversuchen wurden 444 µg renaturierte 16S RNA mit a) 0.01 mg, b) 0.015 mg, c) 0.017 mg, d) 0.02 mg und e) 0.024 mg trägergebundener RNase A inkubiert. Die Verwendung von trägergebundener RNase hatte den Vorteil, daß hohe Ausbeuten an S4-RNA auch in Abwesenheit von S4 erzielt und die Hydrolyse unabhängig von der Fraktionierungs-Methode durch niedertourige Zentrifugation des Hydrolysats beendet werden konnte. In dem Vorversuch wurden die Hydrolysate anschließend in 5%igen Polyacrylamidgelen fraktioniert. Die Abbildung 54 zeigt die mit Pyronin G angefärbten Polyacrylamidgele, in denen unterschiedlich verdaute Proben fraktioniert wurden.

Entsprechend der Hydrolysebedingung e) wurden 9 mg in TMK-Puffer vorinkubierte 16S RNA mit 4.8 mg RNase A inkubiert. Nach Entfernung des Enzyms wurde das Hydrolysat durch Gelfiltration in A 0.5 Agarose Säulen fraktioniert.

Die Absorption des Eluats wurde während des Laufs bei der Wellenlänge 254 nm aufgezeichnet. Die Abbildung 55 zeigt ein typisches Elutionsprofil des Hydrolysats renaturierter 16S RNA.

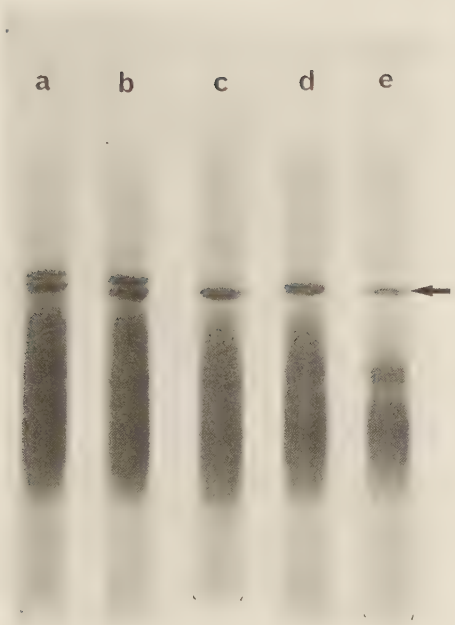


Abbildung 54: Fraktioniertes RNase A Hydrolysat proteinfreier 16S RNA.

444 µg renaturierte 16S RNA wurde in mehreren Ansätzen mit ansteigenden RNase A Konzentrationen hydrolysiert und anschließend in 5%igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt (s. "Methoden": 3.3.3).
Der Pfeil zeigt auf die S4 $RNA_{panc.}$.

Hydrolyse mit:
a) 0.010 mg RNase A
b) 0.015 mg RNase A
c) 0.017 mg RNase A
d) 0.020 mg RNase A
e) 0.024 mg RNase A

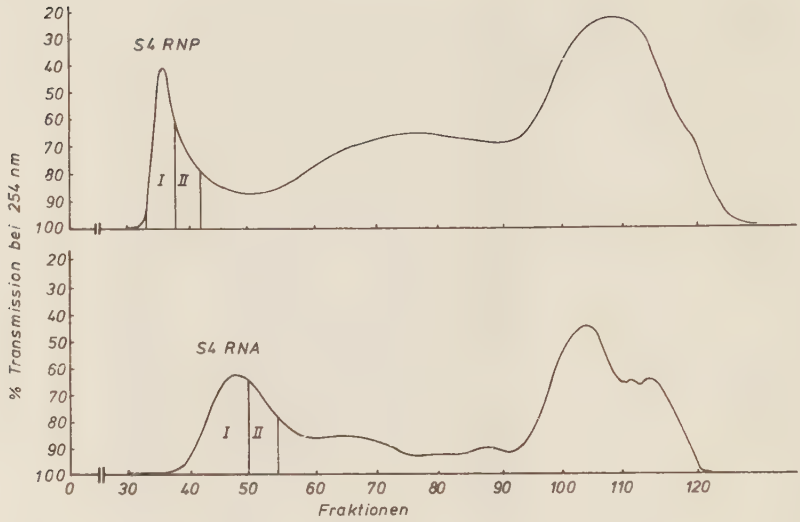


Abbildung 55: Elutionsprofile von RNase A Hydrolysaten renaturierter 16S RNA und S4-16S RNA-Komplexe.

Renaturierte 16S RNA und S4-16S RNA-Komplexe wurden mit trägergebundener RNase A verdaut und anschließend durch Gelfiltration in einer A 0.5 Agarosesäule fraktioniert.
Die Absorption der Eluate bei 254 nm wurde von einem LKB-Uvicord-System aufgezeichnet. Die Gipfelfraktionen I und II wurden getrennt gesammelt, weil die Gipfel II mit kleineren RNA-Fragmenten verunreinigt waren.

Die Ausbeuten an S4-RNA$_{panc.}$ schwankten je nach Qualität der renaturierten 16S RNA zwischen 65 und 75 % des theoretisch erreichbaren Wertes, der bei 27 % der Masse der eingesetzten 16S RNA liegt. Bei der anschließenden Äthanolfällung der Fragmente aus den gesammelten Gipfelfraktionen gingen etwa 10 - 20 % S4-RNA verloren.

Die Gipfelfraktionen I enthielten reine monomere S4-RNA Fragmente, die den gleichen R_F-Wert aufwiesen wie die im letzten Abschnitt beschriebenen ^{32}P S4-RNA$_{panc.}$ Fragmente (siehe Polyacrylamidgel in Abb. 56).

Die Gipfelfraktionen II waren zusätzlich mit kleineren RNA-Fragmenten verunreinigt, die zum Teil auch aus dem Bindungsbereich von S4 stammten (S. Polyacrylamidgel c in Abb. 56).

In einigen Experimenten betrugen diese Verunreinigungen bis zu 50 %. Um die S4-RNA aus diesen Fraktionen aufzureinigen, wurde sie nach Fällung mit 2 Volumina Äthanol in TMK-Puffer aufgenommen und anschließend durch einen 5-20%igen Sucrosegradienten zentrifugiert (s. Trennungsprofil in Abb. 57). Der Gipfel II des Trennungsprofils enthielt die gereinigten S4-RNA-Fragmente, während im Gipfel I die leichteren Verunreinigungen sedimentierten (s. Polyacrylamidgele in Abb. 58).

In Rekonstitutions-Experimenten wurde überprüft, ob die isolierte S4-RNA noch die Fähigkeit besaß, mit dem Protein S4 in spezifische Wechselwirkung zu treten.

Nach Inkubation geringfügig verunreinigter S4-RNA mit einem molaren Unterschuß an bindungsfähigem S4 konnten nach der Elektrophorese des Rekonstitutionsgemischs in 5%igen Polyacrylamidgelen zwei RNA-Banden nachgewiesen werden. Die untere Bande enthielt monomere proteinfreie S4 RNA, während das rekonstituierte S4-RNP in der Bande darüber wanderte (siehe Abb. 59).

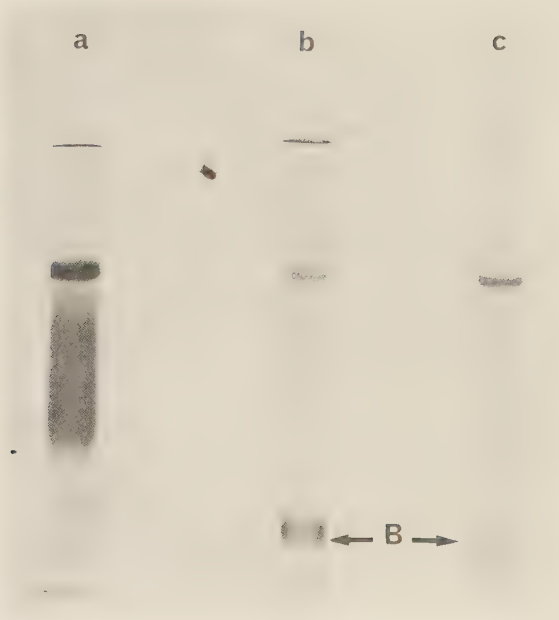


Abbildung 56: S4-RNA$_{panc.}$ vor und nach der Gelfiltration

a) Hydrolysat renaturierter 16S RNA
b) Gipfelfraktionen I
c) Gipfelfraktionen II
B = Bromphenolblau

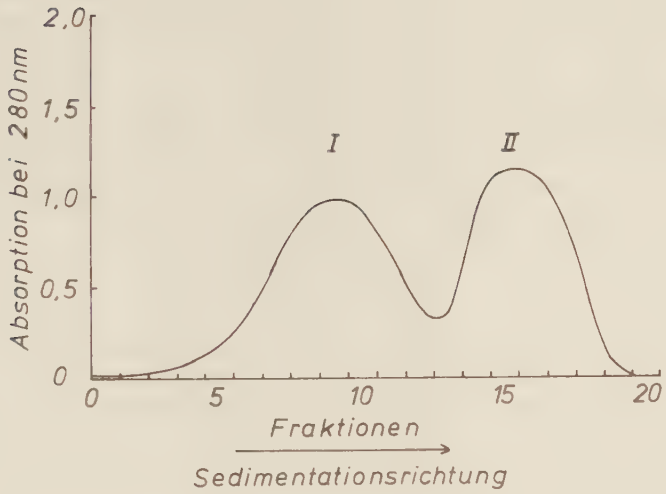


Abbildung 57: Reinigung der S4-RNA$_{panc.}$ durch Zentrifugation in Sucrosegradienten.

Die verunreinigte S4-RNA$_{panc.}$ aus den Gipfelfraktionen II des Elutionsprofils in Abbildung 55 wurde durch Zentrifugation in linearen 5-20%igen Sucrosegradienten (12 ml) gereinigt (s. "Methoden").
Der Gipfel II des Trennungsprofils enthielt die S4-RNA$_{panc.}$.

In einigen Experimenten konnte ein Aggregat nachgewiesen werden, das aber nur in geringen Mengen vorlag.
In einem Kontrollexperiment konnte gezeigt werden, daß das Protein L24 nicht mit dem Fragment in Wechselwirkung trat.

Die Hydrolyse von spezifischen S4-16S RNA Komplexen führte direkt zu S4-RNPs, die im ausgeschlossenen Volumen aus der Agarose A 0.5 Säule eluiert wurden (s. Eluationsprofil in Abb. 55). Die Polyacrylamidgele in Abbildung 60 zeigen die gesammelten S4-RNPs aus dem Gipfel I.

4.5 Stabilität der S4-RNA und S4-RNPs während der Lagerung

Als Präzipitate bei -80°C gefroren, konnten S4-RNA-Fragmente und S4-RNPs über längere Zeit (mindestens 6 Monate) aufbewahrt werden, ohne daß sie die Fähigkeit verloren, mit dem Protein S4 in spezifische Wechselwirkung zu treten, oder daß das Protein S4 von der RNA dissoziierte.

Abbildung 58: Analyse der RNA aus der Gipfelfraktion I des Trennungsprofils in Abbildung 57.

Die S4-RNA wurde aus den gesammelten Gipfelfraktionen I und II mit Äthanol gefällt und in 5%igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch fraktioniert.

a) Gipfel I
b) Gipfel II

Abbildung 59: Rekonstituierte S4-RNPs

$S4\text{-}RNA_{panc.}$ wurde mit S4 im molaren Unterschuß und Überschuß in TMK-Puffer inkubiert. Komplexe und freie S4-RNA wurden in 5%igen Polyacrylamidgelen fraktioniert. Die RNA in den Gelen A1 und B1 wurden mit Pyronin G und S4 in den übrigen Gelen mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt.

A: S4-RNPs und S4-RNA nach Inkubation der S4-RNA mit einem molaren Unterschuß an S4

B: S4-RNPs nach Inkubation der S4-RNA mit einem molaren Überschuß an S4

Abbildung 58:

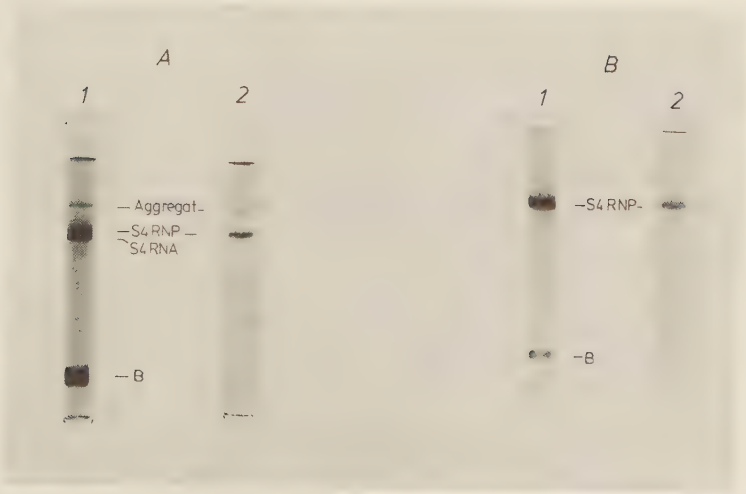


Abbildung 59:

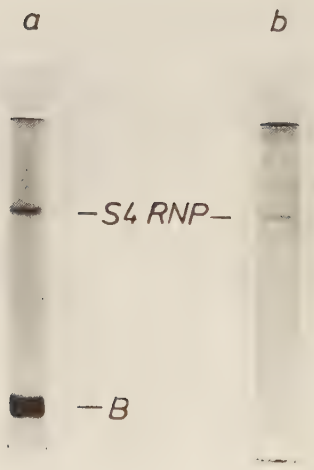


Abbildung 60: S4-RNPs aus den gesammelten Gipfelfraktionen I des Trennungsprofils aus Abbildung 55.

Die RNPs wurden mit Äthanol aus den gesammelten Gipfelfraktionen gefällt und in TM-Puffer aufgenommen. Die Reinheit der RNPs wurde durch die Elektrophorese eines Aliquots in 5%igen Polyacrylamidgelen überprüft.

a) $S4\text{-}RNP_{panc.}$ mit Pyronin G angefärbt

b) $S4\text{-}RNP_{panc.}$ mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt

Die S4-RNA und RNPs wurden in Pufferlösungen aufgenommen, deren pH zwischen 7 und 8 lag, und die mindestens 0.005 M Magnesium-Ionen enthielten. Magnesium konnte auch nicht durch hohe Konzentrationen monovalenter Metall-Ionen ersetzt werden.
In TM oder TMK-Puffer gelöste Fragmente oder RNPs wurden in Aliquoten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gefroren aufbewahrt. Die Lösungen wurden bei 20°C im Wasserbad zügig aufgetaut und anschließend in Eis gekühlt aufbewahrt. Häufiges langsames Einfrieren und Auftauen der Fragmentlösungen führte zu Aggregationen der Fragmente und Dissoziationen von Subfragmenten.

4.6 Optimale Inkubationstemperatur und -zeit für die Rekonstitution der S4-RNA-Fragmente mit dem Protein S4

Um die optimale Inkubationstemperatur und -zeit für die Rekonstitution der S4-RNA mit dem Protein S4 zu ermitteln, wurde die S4-RNA in einer Versuchsreihe mit dem Protein S4 bei 0°C und 37°C 3, 17, 22, 42 und 72 Minuten lang in TMK-Puffer inkubiert.

Nach der Elektrophorese der Inkubationsgemische in 5%igen Polyacrylamidgelen und Anfärben der Komplexe wurden die Banden densitometriert. Es zeigte sich, daß die Bindung von S4 an die RNA schon nach 3 Minuten Inkubationszeit vollständig erfolgt war.
Aufgrund dieses Resultats wurden alle weiteren Rekonstitutions-Experimente bei niedrigen Temperaturen durchgeführt, um eine Destabilisierung der S4-RNA zu vermeiden.

In einem weiteren Experiment wurde die Absorptionsänderung der S4-RNA bei 258 nm während der Inkubation mit S4 in einem Cary 16 Spektrophotometer bei 25°C gemessen. Kontrollmessungen wurden bei 320 nm durchgeführt. Außerdem wurde die Absorption von S4 bei 258 nm kontrolliert.

Die graphische Darstellung in Abbildung 61 zeigt, daß nach Zugabe von S4 in das Inkubationsgemisch die Absorption der

S4 RNA sofort um 0.024 A_{258} anstieg.
Das nicht bindende Protein L23, mit dem ein Kontrollexperiment durchgeführt wurde, hatte keinen Effekt auf die Absorption der S4-RNA.

4.7 Die thermische Stabilität der S4-RNA und S4-RNPs

Die Denaturierung von Nukleinsäuren wird von einer Zunahme der Lichtabsorption im nahen UV-Bereich (hyperchromer Effekt) begleitet. Dieser Effekt beruht auf kooperativem und nichtkooperativem Ausschmelzen geordneter Nukleinsäurestrukturen (Sekundär- und Tertiär-Strukturen).

Abbildung 61: Absorptionsänderung der S4-$RNA_{panc.}$ während der Inkubation mit S4.

Die S4-RNA wurde in TMK-Puffer gelöst und mit S4 vermischt. Die Absorption der RNA bei 258 nm wurde bei 20°C in einem Cary-Spektrophotometer gemessen (s. "Methoden": 3.10, Teil I).

In einem Kontrollexperiment wurde die S4-$RNA_{panc.}$ mit dem Protein L23 inkubiert. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe von S4 bzw. L23 an.

———— : S4

-------- : L 23

Die Gele im oberen Teil der Abbildung zeigen das Ausmaß der Bindung von S4 an die S4 $RNA_{panc.}$ nach (A) 3, (B) 40 und (C) 70 Minuten.

Abbildung 62: Thermische Denaturierung von S4 RNPs und S4 RNA.

-------- : S4-RNA

———— : S4-RNP

A1 und A2 : S4-RNP und S4-RNA nach Erwärmung auf 25°C
B1 und B2 : S4-RNP und S4-RNA nach Erwärmung auf 43°C
C1 und C2 : S4-RNP und S4-RNA nach Erwärmung auf 52°C
(s. "Methoden": 3.10, Teil I)

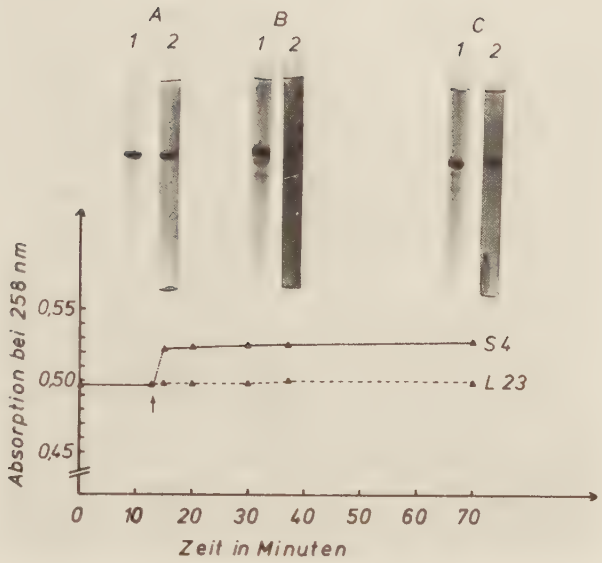


Abbildung 61:

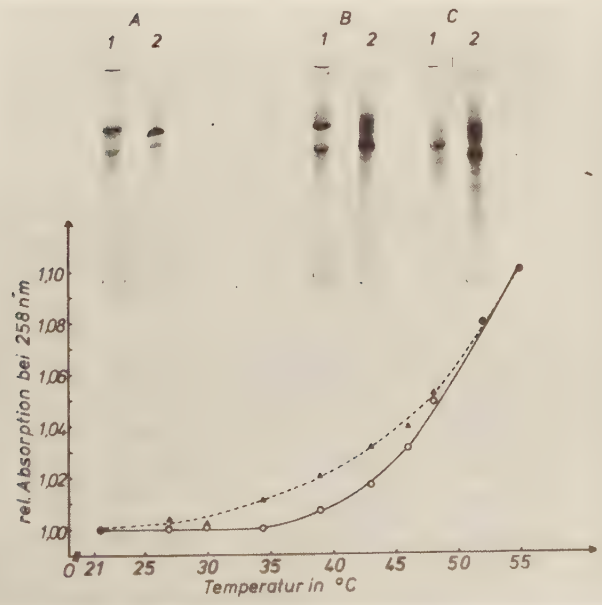


Abbildung 62:

Der Verlauf der thermischen Denaturierung der S4-RNA und S4-RNPs konnte daher mit Hilfe eines Cary-Spektrophotometers bei 258 nm verfolgt werden.

Parallel zu diesem Experiment wurden Proben mit S4-RNA und S4-RNPs kurzfristig auf 22, 44 und 55°C erwärmt, in flüssigem Stickstoff abgekühlt und anschließend in 5%igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die schockartige Abkühlung sollte Renaturierung verhindern.

Aus der Abbildung 62, die die Schmelzkurven der S4-RNA und S4-RNPs sowie ihr elektrophoretisches Verhalten nach Erwärmung auf unterschiedliche Temperaturen zeigt, geht hervor, daß das Protein S4 seinen spezifischen Bindungsort gegenüber thermischer Denaturierung stabilisiert. Aus der Abbildung 63 ist zu ersehen, daß die S4-RNA den gleichen Tm-Wert wie intakte 16S RNA aufwies (69°C) (s. Abb. 9a).
Allerdings begann die S4-RNA bei niedrigeren Temperaturen als 16S RNA auszuschmelzen. Die Hyperchromizität der 16S RNA betrug bei 258 nm 33 % und die des Fragments 34 %.

Dieses Resultat zeigt, daß in der S4-RNA der Anteil der Basen, die einen Beitrag zur Sekundär- und Tertiärstruktur des Fragments liefern, genauso hoch ist wie der Anteil der Basen, der in der intakten 16S RNA an der Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur beteiligt ist.

4.8 Der Einfluß der Proteine S4, S20 und L19 auf den Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von 16S RNA und S4-16S RNA Komplexen

Diese Untersuchung knüpfte an die Experimente in Abschnitt 4.3.2 an, mit denen gezeigt worden war, daß unter identischen Hydrolysebedingungen die 16S RNA nach Bindung von S20 stärker hydrolysiert wurde als renaturierte proteinfreie 16S RNA und mit S4 rekonstituierte 16S RNA.
In mehreren Ansätzen wurden renaturierte 16S RNA und spezifische S4-16S RNA-Komplexe unter Standardbedingungen mit RNase A inkubiert. Nach vier Stunden wurde mit Ausnahme von zwei Kontrollen zu jedem Ansatz S4, S20 oder L19 pipettiert und die

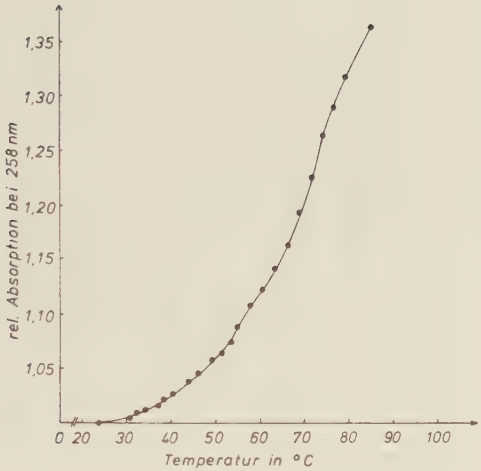


Abbildung 63: Schmelzkurve der S4 $RNA_{panc.}$

Hydrolyse in Gegenwart eines dieser Proteine fortgesetzt. Die Polyacrylamidgele in Abbildung 64 zeigen, daß die verschiedenen Proteine die Hydrolyse der 16S RNA sehr unterschiedlich beeinflußten. Die Fortsetzung der Hydrolyse in Gegenwart von S4, das sofort mit dem Fragment in spezifische Wechselwirkung trat, verringerte die Ausbeuten an S4-RNA bzw. S4-RNP gegenüber der Kontrolle um 21 %. Das Protein S20, das mit dem Fragment nicht in spezifische Wechselwirkung trat, verringerte die Ausbeuten an S4-RNA um 62 %. Keinen Einfluß auf die Hydrolyse der 16S RNA hatte dagegen das Protein L19.
Das Protein S20 reduzierte ebenfalls die Ausbeuten an S4-RNPs im Verlauf der Hydrolyse von spezifischen S4-16S RNA-Komplexen. Wurde jedoch während der Hydrolyse von S4-16S RNA-Komplexen zusätzlich S4 in das Inkubationsgemisch pipettiert, dann verringerten sich die Ausbeuten an S4-RNPs nicht.

In einem weiteren Experiment wurde die isolierte S4-RNA in Abwesenheit von RNasen mit den Proteinen S20 und S16/17 bei 0°C in TMK-Puffer inkubiert. Aus der Abbildung 64 ist zu ersehen, daß diese Proteine die Struktur der S4-RNA veränderten. Das Protein L19 hatte keinen Effekt auf die Struktur der S4-RNA.

4.9 Die Zugänglichkeit der S4 RNA und S4 RNPs für den Farbstoff Ethidium-Bromid

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wurde schon ausführlich beschrieben, daß vergleichende Bindungsuntersuchungen mit dem Farbstoff Ethidium-Bromid Rückschlüsse auf RNA-Konformationen zulassen.
Eine ähnliche Untersuchung wurde mit der S4-RNA und S4-RNPs in TM-Puffer durchgeführt.
Es konnte gezeigt werden, daß proteinfreie S4-RNA 15 und S4-RNPs 7 Bindungsorte für Ethidium-Bromid enthielten.

Abbildung 64: Einfluß verschiedener Proteine auf den Verlauf der Hydrolyse renat. 16S RNA und S4-16S RNA-Komplexe sowie auf die Struktur der S4 $RNA_{panc.}$

Während der Hydrolyse von 16S RNA und S4-16S RNA-Komplexen mit trägergebundener RNase A wurden die Proteine S20, S4 oder L19 hinzupipettiert. Die isolierte S4 $RNA_{panc.}$ wurde mit S20 und S16/17 inkubiert. Nach Beendigung der Hydrolyse oder Inkubation wurden die Proben in 5%igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch fraktioniert (s. "Methoden": 3.3.2.2). Die Intensitäten der S4-RNA bzw. S4-RNP wurden mit einem Densitometer bestimmt.

a)	16S RNA + RNase A	(100%)	S4 RNA
b)	16S RNA + RNase A + S4	(79%)	S4 RNA
c)	16S RNA + RNase A + S20	(38%)	S4 RNA
d)	S4-16S RNA + RNase A 1. Pyronin G Färbung 2. Coomassie Brilliant Blau Färbung	(100%)	S4 RNP
e)	S4-16S RNA + RNase A + S20	(50%)	S4 RNP
f)	16S RNA + RNase A + L19	(100 %)	S4 RNA
g)	S4 $RNA_{panc.}$		
h)	S4 $RNA_{panc.}$ + S20 (im Unterschuß)		
i)	S4 $RNA_{panc.}$ + S16/17		

5. Diskussion

5.1 Beschreibung der S4- und S4-S20 RNPs, die mit T_1-RNase präpariert wurden

Kontrollierte enzymatische Hydrolyse der RNA rekonstituierter S4-16S RNA-Komplexe mit T_1-RNase führte innerhalb eines breiten Bereichs unterschiedlich hoher Enzymkonzentrationen zu zwei spezifischen S4-RNPs (S4-RNP I und S4-RNP II), die sich in ihren Molekulargewichten voneinander unterscheiden. Die RNA des größeren S4-RNP I umfaßte 530 Nukleotide und erstreckte sich mit Unterbrechungen von Sektion L bis zur Sektion O.
Die RNA des kleineren S4-RNP II (447 Nukleotide) reichte mit Unterbrechungen von Sektion L bis zur Sektion C".
Mit ansteigender Enzymkonzentration erhöhten sich die Ausbeuten des S4-RNP II auf Kosten des S4-RNP I, bis letzteres nicht mehr im Hydrolysat nachgewiesen werden konnte. Drei RNA-Segmente aus den 16S RNA-Sektionen L, C", D' und O, die im S4-RNP I nachzuweisen waren, fehlten im S4-RNP II und führten zur Differenz von 83 Nukleotiden zwischen den RNA-Teilen beider RNPs. Die drei Segmente liegen im 16S RNA Strang 250, 500 und 750 Nukleotide weit voneinander entfernt (siehe Blockdiagramm in Abb. 15). Der Übergang vom S4-RNP I zum S4-RNP II, der bei ansteigender Enzymkonzentration zu beobachten war, erfolgte stufenlos ohne nachweisbare Zwischenprodukte (siehe Abb. 10).
Da dieser Übergang mindestens zwei Enzymschnitte gleichzeitig erfordert, ist anzunehmen, daß die drei Segmente aus den Sektionen L, C", D' und O in enger struktureller Beziehung zueinander stehen. Ein Enzymschnitt in einem der RNA-Segmente könnte kooperativ weitere ermöglichen, die sofort die Dissoziation und Degradierung der anderen beiden Segmente zur Folge hätten.
Weitere Erhöhung der Enzymkonzentration verringerte auch die Ausbeuten an S4-RNP II, ohne daß ein weiterer Übergang zu einem kleineren spezifischen S4-RNP erfolgte. Gleichzeitig erhöhte sich die Häufigkeit von Enzymschnitten in einigen Positionen der S4-RNA II.

5.2 Spezifische RNA-RNA-Wechselwirkungen

Aus dem Blockdiagramm, das die Ergebnisse der Primärstrukturanalysen beider S4-RNPs zusammenfaßt (siehe Abb. 15), ist ersichtlich, daß sich die S4-RNA I und die S4-RNA II über fünf bzw. sechs RNA-Bereiche erstrecken, die in der Primärstruktur nicht zusammenhängen.
221 Nukleotide, die zwischen den Sektionen C" und D' fehlten, führten zur größten Lücke in der S4-RNA I. Die anderen Lücken in der S4-RNA I und II kamen durch den Verlust von 5 bis 40 Nukleotiden zustande.

Es stellte sich nun die Frage nach dem Typ der Wechselwirkungen, die die Subfragmente in den RNPs zusammenhalten.
Folgende Arbeitshypothesen bildeten die Grundlage für weitere Experimente:

1) Jeder RNA Bereich enthält einen spezifischen Bindungsort für das Protein S4. Typ der Wechselwirkung: Protein-RNA (Kurland 1974).

2) Das Protein S4 besitzt nur einen spezifischen Bindungsort auf der RNA, der von allen RNA-Bereichen gemeinsam geformt wird. Das Protein könnte Berührungspunkte mit mehreren RNA-Bereichen haben; diese werden aber nicht einzeln vom Protein erkannt. Typ der Wechselwirkung: RNA-RNA.

3) Der Zusammenhalt aller nicht kovalent verknüpften RNA-Bereiche beruht auf einer Synthese der unter 1) und 2) vorgeschlagenen Möglichkeiten. Typ der Wechselwirkung: RNA-RNA und Protein-RNA.

Zwei unterschiedliche Wege wurden beschritten, um eine der drei Hypothesen zu beweisen:

1) Schonende Deproteinisierung des S4-RNP II

2) Sequenzanalysen RNase-resistenter proteinfreier 16S RNA-Fragmente

ad 1): Durch schonende Deproteinisierung des S4-RNP II und Analyse der proteinfreien S4-RNA II konnte gezeigt werden, daß

starke RNA-RNA Wechselwirkungen die meisten Subfragmente der S4-RNA II zusammenhalten.
Folgende Spezifitätskriterien wurden von den RNA-RNA-wechselwirkungen befriedigt:
a) Die miteinander in Wechselwirkung stehenden RNA-Subfragmente lagen in äquimolaren Mengen vor.
b) Der spezifische Bindungsort von S4 konnte nach vollständiger Denaturierung in EDTA und Harnstoff aus einem Gemisch seiner Subfragmente rekonstituiert werden.

ad 2): Ausgeprägte RNA-RNA Wechselwirkungen könnten einen wesentlichen Beitrag zur RNase-Resistenz beider S4-RNPs leisten.
Um diese Hypothese nachzuprüfen, wurde das Hydrolysat von proteinfreier 16S RNA untersucht, die in TMK-Puffer vorinkubiert (renaturiert) und unter gleichen Bedingungen verdaut worden war wie die spezifischen S4-16S RNA Komplexe.
In der Tat wurden zwei große RNA-Fragmente (K I und K II) aus dem Hydrolysat isoliert, die die gleiche Sequenz wie die S4-RNA I und II aufwiesen.

Dieses Ergebnis bestätigte, daß alle Subfragmente der S4-RNA I und II nur durch RNA-RNA Wechselwirkungen zusammengehalten werden, die auch dem Bindungsort von S4 seine hohe RNase-Resistenz verleihen.
Die Subfragmentmuster der K II und S4-RNA II waren einander sehr ähnlich. Unterschiede betrafen nur die Ausbeuten der großen Subfragmente, die in der S4-RNA II höher als in der K II RNA waren, und zwei neue Subfragmente (x und y) in der K II RNA, die bisher nicht in der S4-RNA II nachgewiesen werden konnten. Wegen der weitgehenden Übereinstimmung der beiden Subfragmentmuster erlaubte ein Vergleich der Schnittpositionen in den RNA-Fragmenten, die in Gegenwart und Abwesenheit von S4 präpariert wurden, keine Aussagen über die Berührungspunkte von S4 auf der RNA.

Ein Unterschied zwischen den RNPs und den proteinfreien Fragmenten bestand jedoch in der unterschiedlichen Resistenz gegenüber T_1-RNase. Bei hohen Enzymkonzentrationen konnte zwar noch ein spezifisches S4-RNP II nachgewiesen werden, aber keine

proteinfreien Fragmente (K I oder K II) mehr.

Die erzielten Ergebnisse erlauben folgende Schlußfolgerungen:

1) In TMK-Puffer vorinkubierte 16S RNA besitzt in ihrer 5'-Hälfte grundsätzlich die gleiche Struktur wie in Gegenwart von S4.

2) S4 tritt vorwiegend mit RNase-resistenten RNA-Bereichen innerhalb seines Bindungsortes in spezifische Wechselwirkung.

3) S4 schützt seinen Bindungsort gegenüber Hydrolysen durch T_1-RNase, indem es entweder das Enzym sterisch behindert oder die kompakte Struktur seines Bindungsortes stabilisiert.

5.3 Lokalisierung spezifischer RNA-RNA Fernwechselwirkungen in der 5'-Hälfte der 16S RNA

Um die Faltung des 16S RNA Stranges zu verfolgen und möglicherweise Informationen über die Natur der spezifischen RNA-RNA Fernwechselwirkungen zu erhalten, wurde der Versuch unternommen, die RNA-Bereiche zu identifizieren, die durch RNA-RNA Wechselwirkungen miteinander verknüpft sind.
Im folgenden werden Wechselwirkungen zwischen Subfragmenten und RNA-Bereichen, die im RNA-Strang weiter als 40 Nukleotide voneinander entfernt liegen, als Fernwechselwirkungen bezeichnet. Als lokal begrenzte Wechselwirkungen werden solche zwischen benachbarten Subfragmenten definiert.
Die Subfragmentanalyse der S4-4U1 RNA (s. Abschn. 4.2.2) zeigte, daß spezifische RNA-RNA Fernwechselwirkungen zwischen Segmenten aus den Sektionen H", H' und H einerseits und I" und C" andererseits auftreten.
Diese Wechselwirkungen bedingen eine Rückfaltung der 16S RNA im Bindungsbereich von S4. Die chemische Natur der RNA-RNA Fernwechselwirkungen konnte nicht aufgeklärt werden. Der Versuch, komplementäre Basensequenzen in den lokalisierten Regionen zu finden, scheiterte, weil die Primärstruktur der 16S RNA in diesen Sektionen noch nicht vollständig aufgeklärt ist.

Lokal begrenzte Wechselwirkungen zwischen Subfragmenten aus den Sektionen L bis F wurden innerhalb der S4-RNA II nachgewiesen. Diese konnten aber experimentell nicht exakt lokalisiert werden.

Zusätzlich zu der RNA-RNA Fernwechselwirkung zwischen Segmenten aus den Sektionen H"-H und I"-C" existiert in der 5'-Hälfte der 16S RNA mindestens eine weitere zwischen Subfragmenten aus den Sektionen D'-O und anderen RNA-Segmenten, die näher am 5'-Terminus der 16S RNA liegen. Experimente zur Lokalisierung dieser Fernwechselwirkung wurde bisher nicht durchgeführt.
Aus dem stufenlosen Übergang vom S4-RNP I zum S4-RNP II, der bei ansteigender Enzymkonzentration zu beobachten war, wurde geschlossen, daß RNA-Segmente aus den Sektionen L, C", D' und O in enger struktureller Beziehung zueinander stehen (s. Abschnitt 5.1). Durch die Rückfaltung des RNA-Stranges innerhalb der S4-RNA II kommen die Segmente aus den Sektionen L und C" räumlich einander sehr nahe. Eine zweite Faltung der RNA zwischen den Sektionen C" und D' (in der S4-RNA I) könnte die Segmente aus den Sektionen D' und O in eine enge strukturelle Beziehung zu den beiden anderen bringen.

Die Tatsache, daß im spezifischen S20-RNP die 16S RNA-Sektionen B bis C" nicht nachzuweisen sind, spricht dafür, daß das Protein S20 in Abwesenheit von S4 die Struktur der 16S RNA in deren 5'-Hälfte ändert und die Sektionen B bis C" für RNasen zugänglich macht.
Weitere Beweise dafür werden in den Abschnitten 5.4 und 5.5 diskutiert.

5.4 Hydrolyseuntersuchungen mit trägergebundener RNase A

Die Hydrolyse von S4-16S RNA-Komplexen und in TMK-Puffer voreinkubierter 16S RNA führte zu RNPs bzw. S4-RNA-Fragmenten, die zwar voneinander unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeiten, aber identische Nukleotidsequenzen aufwiesen. Die Molekulargewichte der geschützten RNA-Fragmente entsprachen

etwa denen der S4-RNA II bzw. der K II RNA.

Im Gegensatz zu der mit T_1 präparierten S4-RNA II war in der S4-$RNA_{panc.}$ die gesamte Sektion M in äquimolaren Mangen nachweisbar. Dafür fehlten die Nukleotide 532 bis 559 aus der Sektion C". Diese Unterschiede beruhen wahrscheinlich auf der unterschiedlichen Substratspezifität der Enzyme und auf dem Träger der RNase A, der verhindert, daß das Enzym in die RNA hineindiffundiert und dort Phosphordiester-Bindungen hydrolysiert.
Letzteres könnte auch die Ursache für die höheren Ausbeuten an S4-$RNA_{panc.}$ gegenüber der K II RNA sein, die mit T_1-RNase präpariert wurde.
Hydrolysen von S4-S20-16S RNA-Komplexen mit RNase A führten zu zwei RNPs, die den mit T_1 präparierten S4-S20-RNPs in ihrer elektrophoretischen Wanderung sehr zu ähneln schienen. Eine Sequenzanalyse wurde bisher noch nicht durchgeführt.

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde ein S20-16S RNA-Komplex zu einem S20-RNP (ca. 250 Nukleotide lang) abgebaut, das die gleiche Beweglichkeit und das gleiche Subfragmentmuster wie das S4-S20-RNP II aufwies.
Dieses Experiment zeigte wiederum deutlich, daß das Protein S20 die RNase-Empfindlichkeit der 16S RNA erhöht, weil die Hydrolyse renaturierter 16S RNA unter gleichen Bedingungen zu einem resistenten RNA-Fragment von ca. 430 Nukleotiden Länge ("S4-$RNA"_{panc.}$) führt.

5.5 Der Einfluß der Proteine S4, S20 und L19 auf die RNase-Resistenz der S4-$RNA_{panc.}$ und S4-$RNPs_{panc.}$

Wurde im Verlauf der Hydrolyse proteinfreier 16S RNA das Protein S4 in das Inkubationsgemisch pipettiert, dann trat es sofort mit seinem Bindungsort in spezifische Wechselwirkung, aber die Ausbeuten an S4-RNA in Form von S4-RNPs waren um 21 % niedriger als in der Kontrolle, zu der kein S4 pipettiert worden war. Freie S4-RNA war im Hydrolysat nicht mehr nachweisbar. Die Ausbeuten an S4-RNPs, die aus dem Hydrolysat spezifischer S4-16S RNA-Komplexe hervorgingen, lagen eben-

falls um 21 % höher als in dem oben beschriebenen Experiment. Zugabe von S4 in das Hydrolysat von S4-16S RNA-Komplexen hatte keinen Einfluß auf die Ausbeuten an S4-RNPs.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß während der Bindungsreaktion das Protein S4 die Konformation der S4-RNA verändert, wodurch die RNase-Empfindlichkeit der S4 RNA erhöht wird.
Nach der Bindungsreaktion nimmt die S4-RNA wahrscheinlich ihre alte Konformation wieder ein. Die Enzymschnitte, die, abgesehen von zwei Ausnahmen, sowohl im RNP als auch in dem proteinfreien Fragment in gleichen Positionen auftreten, sprechen für diese Hypothese.

Weniger wahrscheinlich ist es, daß das Protein S4 im Verlauf der Bindungsreaktion spezifische RNA-RNA Wechselwirkungen aufhebt und seinerseits die kompakte Konformation des Fragments aufrecht erhält.

Der Einfluß des Proteins S20 auf die Ausbeuten an S4-RNA sind noch viel ausgeprägter. Unter gleichen Versuchsbedingungen verringerten sich die Ausbeuten nach Zugabe von S20 in das Inkubationsgemisch um 62 %. Eine stabile Wechselwirkung zwischen S20 und der S4-RNA erfolgte nicht.
Zum Zeitpunkt der Zugabe von S20 in das Inkubationsgemisch müssen demnach die RNA-Bereiche, die für eine spezifische Bindung von S20 an die RNA erforderlich sind (wahrscheinlich Segmente aus den Sektionen Q, R und M), schon von der RNase verdaut sein.
In gleicher Weise verringert S20 die Ausbeuten von S4-RNPs, wenn es unter gleichen Versuchsbedingungen in das Hydrolysat von S4-16S RNA-Komplexen pipettiert wurde.

Mit einem Kontrollexperiment konnte gezeigt werden, daß das Protein L19 keinen Einfluß auf die Ausbeuten der S4-RNA hatte. Die Inkubation der isolierten S4-RNA mit den Proteinen S20 oder S16/17 in Abwesenheit von RNasen führten ebenfalls zu Störungen der Struktur der S4-RNA, ohne daß eine spezifische Wechselwirkung zwischen den Proteinen und der RNA nachgewiesen werden konnte. Das Protein L19 hatte wiederum keinen Einfluß auf die Struktur der S4-RNA.

Die Interpretation dieser Versuchsergebnisse ist nur spekulativ. Es wäre aber denkbar, daß alle Proteine, die einen mit dem Protein S4 überlappenden Bindungsort auf der 16S RNA besitzen, eine Affinität zur S4-RNA besitzen.
Die unspezifische Wechselwirkung dieser Proteine mit der RNA könnte zu Deformationen führen, die in Gegenwart von RNasen oder durch Dissoziationen von RNA-Subfragmenten zur Zerstörung der S4-RNA führen.

5.6 Ein Vergleich der hypothetischen Sekundärstruktur der 16S RNA im Bindungsbereich von S4 mit den Positionen der Enzymschnitte

Die Kenntnis von den exakten Positionen der Enzymschnitte in der S4-RNA und von den Wechselwirkungen zwischen Subfragmenten der S4-RNA ermöglichen eine Beurteilung der von Ehresmann und Mitarbeitern (1972; 1975 a/b) vorgeschlagenen Sekundärstruktur der 16S RNA im Bindungsbereich von S4.

Für das Sekundärstruktur-Modell wurden nur lokal begrenzte Wechselwirkungen zwischen komplementären Basen angenommen. Daraus resultierte eine RNA-Struktur mit unterschiedlich stabilen helikalen Bereichen (s. Einleitung).
Da die Enzyme T_1 und RNase A Phosphordiester-Bindungen vorwiegend in einzelsträngigen RNA-Bereichen hydrolysieren, sollten alle Enzymschnitte in den inter- und intrahelikalen Einzelstrang-Bereichen der postulierten Sekundärstruktur zu finden sein.

Die Tabelle XIV enthält neben allen Enzymschnitten, die in den beiden S4-RNA-Fragmenten (T_1) und in der $S4\text{-}RNA_{panc.}$ lokalisiert wurden, eine Spalte, aus der ersichtlich ist, ob ein Enzymschnitt mit der vorliegenden Sekundärstruktur vereinbar ist oder nicht.
Die Untersuchung berücksichtigt nicht die Enzymschnitte in der S4-S20-RNA I und in der S20-RNA, weil S20 die Sekundärstruktur des Bindungsortes geändert haben könnte.

Tabelle XIV: Ein Vergleich der Positionen der Enzymschnitte in den S4-RNPs und S4-RNA-Fragmenten mit der hypothetischen Sekundärstruktur der 16S RNA.

Position des Enzymschnitts		hypothetische Struktur der 16S RNA an der Schnittstelle				Übereinstimmung mit dem hypothetischen Sekundärstruktur-Modell der 16S RNA
Nukleotid	Sektion	Inter-helikal	intra-helikal (Haarnadel-schleife)	intra-helikal (einseitig oder beidseitige Ausstülpungen; G-U Basenpaare)	doppel-stängige RNA-Segmente	
30	L			+		(+)
35	L			+		+
52	L		+			+
54	L		+			+
85	L					?
87	L					?
(88)	H"					?
(114)	H"					?
(123)	H'					?
156	H				+	-
157	H				+	-
177	H		+			+
183	Q'				+	-
185	Q'			+		+
186	Q'			+		+
194	Q'	+				+
207	F		+			+
210	F		+			+
242	Q	+				+
245	Q					?
277	R					?
279	R					?
280	R					?

293	G		+			+
295	G		+			+
300	G		+			+
312	M	+				+
322	M		+			+
337	M			+		(+)
361	M	+				+
363	B	+				+
364	B	+				+
407	I'	+				+
418	I'	+				+
423	I'			+		+
427	I'			+		+
434	I			+		(+)
435	I			+		(+)
480	I		+			+
494	I"				+	-
495	I"	+				+
506	I"			+		+
517	C"			+		(+)
518	C"			+		+
532	C"			+		(+)
559	C"				+	-
572	C"	+				+
793	D'			+		+
820	D'				+	-
834	O			+		(+)

+ : Übereinstimmung mit der Sekundärstruktur

(+) : bedingte Übereinstimmung mit der Sekundärstruktur

- : keine Übereinstimmung mit der Sekundärstruktur

? : keine Aussage über die Sekundärstruktur möglich

Sektion L: Die Enzymschnitte sind mit der vorliegenden Sekundärstruktur in der Sektion L vereinbar, wenn davon ausgegangen wird, daß schwache Wechselwirkungen zwischen Guanin und Uracil nicht zu einer Resistenz gegenüber RNasen führen. Über die Schnitte 85 und 87 können keine Aussagen getroffen werden, weil aufgrund der fehlenden Sequenz in Sektion H keine Sekundärstruktur postuliert werden konnte.

Sektionen H" und H': Wegen unzureichender Sequenzergebnisse konnte für diese beiden RNA Sektionen keine Sekundärstruktur abgeleitet werden.

Sektionen H und Q': In diesen beiden Sektionen lassen sich nur die Enzymschnitte 173, 185 und 194 mit der postulierten Sekundärstruktur vereinbaren. Die übrigen drei Schnitte (156, 157, 183) hydrolysieren Phosphordiesterbindungen in doppelhelikalen Segmenten. Mit Kenntnis der Primärstruktur der benachbarten Sektionen H" und H' ist es vielleicht möglich, eine Sekundärstruktur abzuleiten, die mit den Positionen der Enzymschnitte besser übereinstimmt.

Sektionen F und Q: Die Enzymschnitte in den Sektionen F und Q stimmen bis auf den Schnitt in Position 245 mit der Sekundärstruktur überein. Über letzteren können keine Aussagen getroffen werden, weil die Sekundärstruktur nur angedeutet wurde.

Sektionen R, G und M: Die Schnitte 277, 279 und 280 in der Sektion R sind mit der vorgezeichneten Sekundärstruktur nicht vereinbar. Obwohl sich alle Enzymschnitte in der Sektion M mit dem Sekundärstrukturmodell korrelieren lassen, erscheint der postulierte doppelhelikale Bereich von Nukleotid 314-335 nicht wahrscheinlich, weil in der S4-RNA II und I sowie in K II und I die Basen 323-361 einschließlich des komplementären Stranges 328-335 überhaupt nicht oder nur submolar nachzuweisen sind.

Sektionen B, I' und I": Bis auf den Enzymschnitt 494 in Sektion I" stimmen die Positionen der Schnitte mit der vorge-

schlagenen Sekundärstruktur überein. Für den größten Teil der Sektion I" muß eine resistente Struktur angenommen werden, weil keiner der acht Guaninreste in dem für I" postulierten interhelikalen Bereich (496-505) von dem Enzym T_1 als Substrat akzeptiert wurde.

Sektion C": Obwohl die Enzymschnitte 517, 518 und 532 mit der vorliegenden Sekundärstruktur übereinstimmen, ist anzunehmen, daß diese nicht korrekt ist, weil der Bereich 518-532 aus dem angenommenen doppelhelikalen Bereich überhaupt nicht oder nur submolar in den RNPs oder RNA-Fragmenten nachweisbar war. Außerdem fällt der Enzymschnitt in Position 559 in einen doppelhelikalen Bereich.

Sektionen D' und Q: Die geforderte Sekundärstruktur dieser beiden Sektionen konnte nicht mit den vorliegenden Versuchsergebnissen bestätigt werden, weil jeweils die komplementären RNA-Stränge angenommener doppelhelikaler Bereiche vollständig (772-787) oder teilweise (835-843) herausgeschnitten wurden. Der Schnitt 820 fällt in einen doppelhelikalen RNA-Bereich.

Lokal begrenzte Wechselwirkungen zwischen Subfragmenten aus der Sektion L und den Sektionen H"-(H) könnten mit dem zwischen Sektion L und H" angedeuteten doppelhelikalen Bereich vereinbart werden.
Die sehr stabile Wechselwirkung zwischen den Sektionen H und Q' ist allein aufgrund der hypothetischen Sekundärstruktur der 16S RNA in diesem Bereich nicht verständlich.

Die Kenntnis von den Positionen der Enzymschnitte (einzelstängige Segmente) in der 5'-Hälfte der 16S RNA und von lokal begrenzten RNA-RNA Wechselwirkungen könnten nach endgültiger Fertigstellung der Sequenz der 16S RNA für ein weiterführendes Sekundärstrukturmodell nützlich sein. Möglicherweise könnte dann auch geklärt werden, ob die spezifischen RNA-RNA Fernwechselwirkungen auf Basenpaarungen zwischen komplementären Basen oder aber auf andere Wechselwirkungen wie Basenstapelungskräfte oder Basentripel zurückzuführen sind.

5.7 Quantitative Isolierung des Bindungsortes von S4

Die quantitative Isolierung der S4-RNA und S4-RNPs läßt sich in zwei Teilschritte gliedern:

1) Kontrollierte enzymatische Hydrolyse
2) Fraktionierung des Hydrolysats

Die kontrollierte Hydrolyse der 16S RNA und S4-16S RNA-Komplexe wurde mit trägergebundener RNase A durchgeführt. Die Verwendung dieses Enzyms hatte den Vorteil, daß die Hydrolyse der RNA unabhängig von der Fraktionierung des Hydrolysats durch niedertourige Zentrifugation beendet werden konnte.

Für die Fraktionierung des Hydrolysats boten sich drei Methoden an:

1) Gelfiltration
2) Zentrifugation in Sucrosegradienten
3) Präparative Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

Von diesen drei Fraktionierungsmethoden besitzt zwar die elektrophoretische das größte Auflösungsvermögen; dennoch ist sie ungeeignet, weil höchstens 8 mg Hydrolysat in einer Gelplatte fraktioniert werden konnten und die Extraktion der RNA-Fragmente und RNPs aus dem Polyacrylamidgel zu großen Materialverlusten führte.
Zusätzlich bestand die Gefahr, daß während der Extraktion schwach gebundene Subfragmente von der S4-RNA dissoziierten.

Die Gelfiltrationsmethode zur Fraktionierung des Hydrolysats wurde der Zentrifugationsmethode vorgezogen, weil sie schneller und bequemer war. Nur verunreinigte Gipfelfraktionen, aus dem Eluat der Agarose-Säulen, die neben der S4-RNA zusätzlich noch andere Fragmente enthielten, wurden mittels Zentrifugation in Sucrosegradienten aufgereinigt. Mit der Gelfiltrationsmethode konnten auf 3 x 200 cm Säulen maximal 53 mg Hydrolysat fraktioniert werden, und die Ausbeuten an S4-RNA betrugen in diesem Falle ca. 10 mg.

5.8 Rekonstitution der S4-RNA mit dem Protein S4 und die thermische Stabilität der S4-RNA und S4-RNPs

a) Rekonstitutionsexperimente:

Für die Rekonstitution der S4-RNA mit dem Protein S4 in TMK-Puffer ist keine lange Inkubation bei hohen Temperaturen erforderlich. Die optimale Bindung erfolgte bei 0°C in sehr kurzer Zeit, so daß sie weder mit einer elektrophoretischen noch mit einer spektroskopischen Methode exakt bestimmt werden konnte.
Die Gründe des Absorptionsanstiegs der S4-RNA bei 260 nm, der im Verlauf der Rekonstitutionsreaktion mit S4 beobachtet wurde, sind nicht bekannt.
Aus den Resultaten kann geschlossen werden, daß weder die S4-RNA noch das Protein S4 durch zugeführte Wärme für die Bindung aktiviert zu werden brauchen. Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wurde schon darauf hingewiesen, daß nur renaturierte 16S RNA mit RNase A zu einem spezifischen S4-Fragment führt.
Während der Isolierung der S4-RNA treten demnach keine Konformationsänderungen auf, die durch Hitzeaktivierung rückgängig gemacht werden müssen.

b) Thermische Stabilität der S4-RNA und S4-RNPs:

Die S4-RNA wies nahezu denselben Betrag an Hyperchromizität auf wie intakte 16S RNA. Der einzige Unterschied bestand in der breiteren Schmelzkurve der S4-RNA und S4-RNPs gegenüber intakter 16S RNA. Es wurde schon darauf hingewiesen, daß sich eine breitere Schmelzkurve auf eine Abnahme der Kooperativität der Schmelzreaktion zurückführen läßt. Der Einfluß von Enzymschnitten auf die Stabilität und Kooperativität des Schmelzvorganges einzelner helikaler Bereiche soll an zwei Beispielen erläutert werden:

Die Differenz an "freier Energie" zwischen dem doppelhelikalen Bereich in Abbildung 64a und dem in Abbildung 64b beträgt etwa 5 kcal, weil dem letzteren die destabilisierend wirkende Haarnadelschleife fehlt. Die Schmelztemperatur des doppelhelikalen Bereichs in Abbildung 64b wird bei höheren Tempera-

turen liegen als die der Struktur in Abbildung 64a. Die Kooperativität des Schmelzvorganges ist in beiden Fällen die gleiche.

In der Struktur in Abbildung 65a wird der obere doppelhelikale Bereich durch den unteren stabilisiert. Der Schmelzvorgang des gesamten doppelhelikalen Bereichs wird kooperativ verlaufen. Ein Enzymschnitt in der Ausstülpung führt dazu, daß der obere instabile Bereich unabhängig vom unteren bei niedrigeren Temperaturen schmilzt (Abb. 65b).

Ein Vergleich der Schmelzkurve des S4-RNPs mit der der proteinfreien S4-RNA zeigt, daß das Protein S4 die S4-RNA gegenüber thermischer Denaturierung stabilisierte. Dieses Ergebnis ist mit dem stabilisierenden Einfluß von Nukleohistonen auf DNA vergleichbar.

Abbildung 64 und 65: Der Einfluß von Enzymschnitten auf den Verlauf der thermischen Denaturierung hypothetischer RNA Sekundärstrukturen.
(Erläuterungen siehe Text)

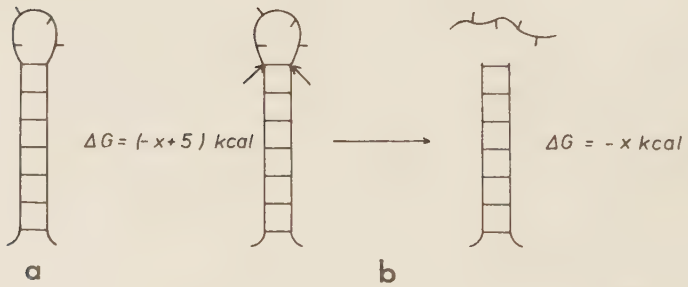


Abbildung 64:

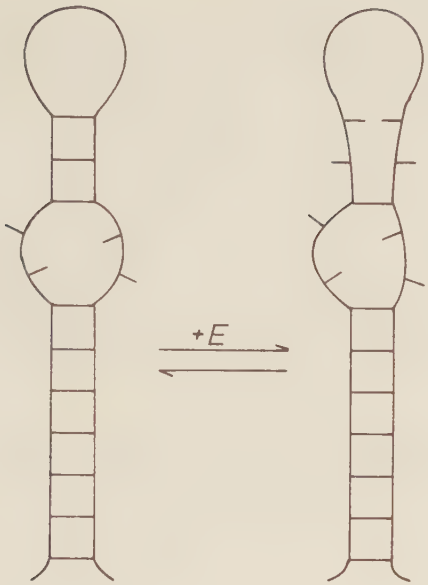


Abbildung 65a:

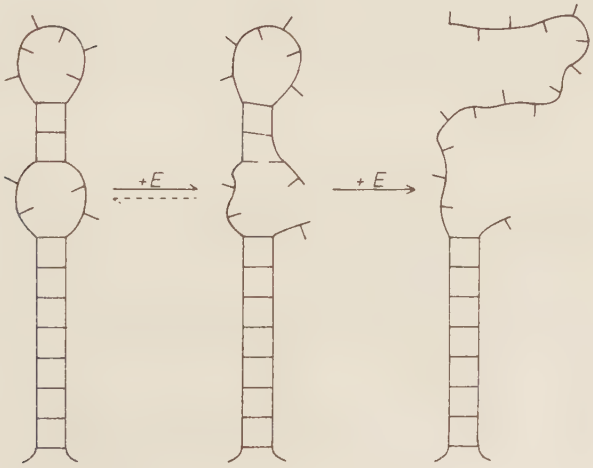


Abbildung 65b:

5.9 Schlußfolgerungen aus den Farbstoffbindungs-Experimenten

Mit proteinfreier S4-RNA traten etwa doppelt so viele Ethidium-Bromid-Moleküle in Wechselwirkung als mit dem S4-RNP. Dieses Resultat könnte zwei Ursachen haben:

1) Das Protein S4 bindet an doppelhelikale RNA-Bereiche und verhindert dadurch direkt die Interkalierung des Farbstoffs.

2) Das Protein S4 verhindert Interkalierungen des Farbstoffs indirekt, indem es in der Nähe von doppelhelikalen Segmenten bindet und dadurch die Helices räumlich fixiert (vgl. Abschn. 5.2, Teil I).

5.10 Ein Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen anderer Arbeitsgruppen

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß 16S RNA in TMK-Puffer in mindestens drei elektrophoretisch voneinander unterscheidbaren Konformationen vorliegen kann. Nur eine dieser Konformationen kann das Protein S4 optimal binden und nach Inkubation mit RNasen ein spezifisches Fragment produzieren, das den Bindungsort von S4 enthält. Das Protein S4 konnte die denaturierte (nicht bindungsfähige) 16S RNA nicht in die native (bindungsfähige) überführen.

Diese Ergebnisse wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit durch den Nachweis spezifischer RNA-RNA Fernwechselwirkungen, die dem Bindungsort von S4 seine kompakte Struktur verleihen, ergänzt.
Die kompakte Struktur der S4-RNA ist wahrscheinlich auch die Ursache ihrer hohen RNase-Resistenz. Ein vergleichbar großer RNase-resistenter Kern ist in der 23S RNA nicht nachzuweisen.

Aus den vorliegenden Resultaten konnte außerdem geschlossen werden, daß in der denaturierten 16S RNA die spezifischen RNA-RNA Fernwechselwirkungen gar nicht oder nur unzureichend

ausgebildet sind.
Signifikante Konformationsänderungen innerhalb der S4-RNA konnten nach Bindung von S4 an die RNA nicht nachgewiesen werden. Die Stabilität der S4-RNA wurde aber in Gegenwart von S4 gegenüber RNasen und thermischer Denaturierung erhöht.

Schaup und Mitarbeiter (1971), denen es als erster Arbeitsgruppe gelang, ein spezifisches S4-RNP zu isolieren, zogen aus ihren Ergebnissen den Schluß, daß das Protein S4 multiple Bindungsorte auf der 16S RNA besitzt. Die spezifische wechselwirkung zwischen dem Protein und seinen verschiedenen Bindungsorten auf der RNA verleiht dieser nach Ansicht der Autoren eine spezifische Raumstruktur, die weiteren 30S Proteinen die Bindung an die RNA ermöglicht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen jedoch aus folgenden Gründen gegen die Vorstellung, daß das Protein S4 unabhängige spezifische Bindungsorte auf der 16S RNA besitzt und durch die Wechselwirkung mit diesen die Raumstruktur der RNA bestimmt:

1) Die Raumstruktur des spezifischen Bindungsbereichs von S4 auf der 16S RNA kann unabhängig von der Gegenwart des Proteins gebildet und aufrechterhalten werden.

2) Mehrere unabhängige spezifische Bindungsorte für das Protein S4 auf der RNA würden wahrscheinlich unterschiedlich stabil sein. Daher wäre zu erwarten, daß partiell denaturierte 16S RNA das Protein S4 zumindest schwach binden kann.

Mackie und Zimmermann (1975) beschrieben kürzlich ein S4-RNP, dessen geschützte RNA nahezu identisch mit der $S4\text{-}RNA_{panc.}$ ist. Die Autoren wiesen darauf hin, daß in dem Fragment die zentralen Sektionen Q, R, G und M in geringeren Ausbeuten im RNP vorlagen. Rückschlüsse auf spezifische RNA-RNA Wechselwirkungen zogen sie in diesem Falle jedoch nicht. Nur die Anwesenheit eines sehr kleinen Subfragments aus der Sektion C" (vergleichbar mit dem Subfragment 16 aus dem S4-RNP II) in ihrem S4-RNP führten sie auf die Sekundär- und/oder Tertiärstruktur der RNA zurück.

Die S4-RNA I, in der neben Subfragmenten aus den Sektionen L-C" auch Subfragmente aus den Sektionen D' und O nachgewiesen wurden, ähnelt dem von Zimmermann und Mitarbeitern (1972) beschriebenen 10S RNA-Fragment, das in Abwesenheit von S4 mit T_1-RNase präpariert wurde. Auch in diesem Falle zogen die Autoren keine Rückschlüsse auf spezifische RNA-RNA-Fernwechselwirkungen.

5.11 Hinweise auf weitere RNA-RNA Fernwechselwirkungen in der 16S RNA

Von verschiedenen Arbeitsgruppen gibt es Hinweise darauf, daß innerhalb der 8S RNA (sie umfaßt ca. 600 Nukleotide aus der 3'-Hälfte des 16S RNA Stranges) RNA-RNA Fernwechselwirkungen auftreten (Muto et al. 1974; Ehresmann et al. 1975a und Rinke, Yuki & Brimacombe 1976):

1) Muto und Mitarbeiter (1974) zeigten, daß sich das 8S-Fragment aus zwei RNA-Bereichen zusammensetzt, deren Stränge in der Sektion K nicht direkt aneinanderstoßen. Der Verlust von 25 Nukleotiden führte zu einer Lücke in der Sektion K, die nur durch RNA-RNA Wechselwirkungen zwischen den Sektionen O', D, E', (K) einerseits und P, P', E, A andererseits überbrückt werden kann.

2) Ehresmann und Mitarbeiter (1975a) machten die Beobachtung, daß Fragmente aus der Sektion A und vom 5'-Ende der Sektion O' miteinander assoziiert vorlagen. Ein Bereich der Sektion O' und der rechte Arm der ersten Schleife in Sektion A sind sehr reich an Guanin und Cytosin und in der Lage, komplementäre Strukturen auszubilden.

3) Rinke, Yuki und Brimacombe (1976) isolierten nach der Hydrolyse von 30S Untereinheiten mit T_1 in Gegenwart von Deoxycholat ein RNP, das die Proteine S7 und S19 enthielt. Mit einer ähnlichen Methode, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde, deproteinisierten die Autoren dieses RNP und zeigten, daß sich die RNA aus zwei Bereichen zusammensetzte, die über eine

Lücke in der Sektion K miteinander in Wechselwirkung standen.

Obwohl den hier zusammengefaßten Hinweisen auf RNA-RNA Fernwechselwirkungen innerhalb der 8S RNA keine Spezifitätskriterien zugrunde gelegt wurden, kann angenommen werden, daß spezifische RNA-RNA Fernwechselwirkungen nicht nur in der 5'-Hälfte der 16S RNA auftreten, sondern auch ihre 3'-Hälfte organisieren.

5.12 Versuche zur Identifizierung der S4-Bereiche, die mit der 16S RNA in Kontakt stehen

1) S4-Mutanten mit stark verändertem C-Terminus binden schwächer als der Wildtyp von S4 an die 16S RNA. Aus diesen Ergebnissen konnte indirekt geschlossen werden, daß der C-Terminus von S4 mit der RNA in Wechselwirkung tritt (Daya-Grosjean et al. 1972).

2) Aus vergleichenden Untersuchungen über die Hydrolyse mit Carboxypeptidasen an freiem und an 16S RNA gebundenem S4 geht hervor, daß der C-terminale Bereich des Proteins in engem Kontakt mit der 16S RNA steht (Daya-Grosjean et al. 1974).

3) Die kontrollierte Hydrolyse der S4-16S RNA-Komplexe mit Trypsin führt zu einem S4-Protein-Fragment, das sich von der Aminosäure in Position 45 bis zum C-Terminus erstreckt. Dieses Fragment besitzt noch die Fähigkeit, mit 16S RNA in spezifische Wechselwirkung zu treten (Schulte et al. 1975; Newberry, persönliche Mitteilung).

4) Um präzise Angaben über die RNA-Kontaktstellen auf dem Protein S4 machen zu können, wurde von Ehresmann, Reinboldt und Ebel (1975) das Protein S4 mit der 16S RNA vernetzt,und die mit der RNA kovalent vernetzten tryptischen Peptide identifiziert. Die Autoren beschrieben vier basische Bereiche (31-43, 56-59, 144-151 und 181-185), von denen sie annahmen, daß sie mit der RNA in direktem Kontakt stehen.

Prinzipiell kann diese Methode auch zur Identifizierung der RNA-Bereiche, die mit dem Protein in Kontakt stehen, herangezogen werden.
Ein solcher Versuch wurde erfolgreich von Rinke, Yuki und Brimacombe (1976) anhand eines spezifischen S7-RNPs durchgeführt.

5) Rückschlüsse darüber, welche Aminosäuren mit der RNA in direktem Kontakt stehen, können aus den Ergebnissen chemischer Modifizierungen des Proteins gezogen werden.
Nach diesen Untersuchungen sind die Aminosäuren Cystein (Position: 31) und Tryptophan (Position: 167) wahrscheinlich nicht an der Wechselwirkung mit der RNA beteiligt (Daya-Grosjean et al. 1974).

Amons et al. (1974) identifizierten zwei Lysinreste in den Positionen 119 und 147, deren Aminogruppe nach Bindung des Proteins an die RNA nicht mehr methyliert werden konnte.

Übereinstimmend geht aus den oben zusammengefaßten Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen hervor, daß der N-terminale Bereich (ca. 30 Aminosäuren) für die spezifische Bindung des Proteins an die 16S RNA nicht erforderlich ist und wahrscheinlich mit dieser auch nicht in Wechselwirkung tritt.

5.13 Ausblick

Die Darstellung der S4-RNA in größeren Mengen ermöglicht, die Struktur des spezifischen Bindungsortes von S4 auf der 16S RNA und die Wechselwirkung zwischen diesem und dem Protein S4 mit physikalisch-chemischen Methoden zu untersuchen.
Um Aussagen über Form und Abmessungen der S4-RNA und des S4-RNPs machen zu können, werden zur Zeit Röntgenkleinwinkel- und Faserstreuungsversuche durchgeführt.
Exakte Informationen über die dreidimensionale Struktur der S4-RNA bzw. des S4-RNPs können allerdings erst aus der Röntgenstrukturanalyse von S4-RNA bzw. RNPs erhalten werden.

Aus diesem Grunde wurden kürzlich Versuche zur Kristallisa-

tion der S4-RNA begonnen.
Mögliche Strukturänderungen im Protein S4 während seiner Bindung an die S4-RNA können mit folgenden spektroskopischen Methoden nachgewiesen werden: Kernresonanz-Spektroskopie, Infrarot-Spektroskopie und Zirkulardichroismus. Versuche dieser Art sind geplant.

D. Zusammenfassung

Das ribosomale Protein S4 von *Escherichia coli* bindet spezifisch nur an native 16S RNA. Die denaturierte Form der 16S RNA wird durch Inkubation zwischen 40° und 60°C in Rekonstitutionspuffer (0.03 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.02 M $MgCl_2$ und 0.35 M KCl) sowie anschließende Abkühlung auf Raumtemperatur in eine native Konformation überführt, die mit dem Protein S4 in spezifische Wechselwirkung treten kann.

Die bindungsfähige 16S RNA unterscheidet sich von der denaturierten Form in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit in kombinierten Agarose-Polyacrylamidgelen und in der Zugänglichkeit für RNasen und den Farbstoff Ethidium-Bromid. Aus dem Verlauf der thermischen Denaturierung beider 16S RNA-Formen wurde geschlossen, daß sie den gleichen Betrag an Sekundärstruktur aufweisen.

Die Analyse des isolierten ^{32}P markierten Bindungsortes von S4 auf der 16S RNA ergab, daß dieser eine kompakte RNase-resistente Struktur besitzt, die durch spezifische RNA-RNA Fernwechselwirkungen aufrechterhalten wird. Eine dieser Wechselwirkungen wurde zwischen den 16S RNA Sektionen H"-H und I"-C" lokalisiert. Eine weitere existiert möglicherweise zwischen den Sektionen D'-O, L und I"-C". Die native und die "denaturierte" Form der 16S RNA unterscheiden sich wahrscheinlich in dem verschiedenen Grad dieser RNA-RNA-Fernwechselwirkung.

Die Identifizierung der Positionen maskierter Enzymschnitte innerhalb des Bindungsbereichs von S4 erlaubte eine Beurteilung der hypothetischen Sekundärstruktur der 16S RNA im Bindungsbereich von S4.

Das Ergebnis ist eine relativ gute Übereinstimmung zwischen RNase-resistenten Bereichen und doppelhelikalen Segmenten im Sekundärstrukturmodell der 16S RNA.

Ein neu entwickeltes präparatives Verfahren ermöglichte die

Darstellung des S4-Bindungsortes in größeren Mengen (bis zu 10 mg). Damit wurde die Voraussetzung für physikalisch-chemische Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen S4 und seinem Bindungsort auf der 16S RNA geschaffen. Erste Ergebnisse mit Hyperchromizitätsmessungen zeigten, daß S4 seinen Bindungsort gegenüber thermischer Denaturierung stabilisierte.

E. Abkürzungen, physikalische Konstanten und Definitionen

EDTA	Äthylendiamintetraacetat
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNP	Protein-RNA Komplex
RNase	Ribonuklease
UpM	Umdrehungen/Minute
IpM	Impulse/Minute (in der vorliegenden Arbeit nur "Čerenkov" Strahlung)
g	Gravitationskonstante (9.81 Meter/sec^2)
S	Sedimentationskoeffizient (sec^{-13})

RNA-Teil des Sx-RNPs = Sx-RNA-Fragment $\xrightarrow{\text{8 M Harnstoff}}$ n · Sx-RNA-Subfragmente

x	Nummer des Proteins
n	Zahl der Subfragmente

z.B.: RNA-Teil des S4-RNPs = S4-RNA-Fragment $\xrightarrow{\text{8 M Harnstoff}}$ 20 S4-RNA-Subfragmente

F. Literaturverzeichnis

Adams, J.M.P., G.N. Jeppensen, F. Sanger & B.G. Barrell. 1969. Nucleotide sequence from the coat protein cistron of R 17 bacteriophage RNA. Nature 223: 1009-1014

Amons, R., W. Möller, E. Schiltz & J. Reinboldt. 1974. Studies on the binding sites of protein S4 to 16S RNA in Escherichia coli ribosomes. FEBS Letters 41: 135-138

Arnott, S., F. Hutchinson, M. Spencer, M.H.F. Wilkins, W. Fuller & R. Langridge. 1966. X-ray diffraction studies of double helical ribonucleic acid. Nature 211: 227-232

Bollen, A., A. Herzog, A. Favre, J. Thibault & F. Gros. 1970. Fluorescense studies on the 30S assembly process. FEBS Letters 11: 49-54

Branlant, C., J. Sri Widada, A. Krol, P. Fellner & J.P. Ebel. 1975. Nucleotide sequences of the T_1 and pancreatic ribonuclease digestion products from some large fragments of the 23S RNA of Escherichia coli. Biochimie 57: 175-225

Brimacombe, R., K.H. Nierhaus, R.A. Garrett & H.G. Wittmann. The ribosome of E. coli. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (im Druck). Herausgeber: W.E. Cohn

Brownlee, G.G., F. Sanger & B.G. Barrell. 1968. The sequence of 5S rRNA. J.Mol.Biol. 34: 379-412

Brownlee, G.G. & F. Sanger. 1969. Chromatography of ^{32}P-labelled oligonucleotides on thin layers of DEAE-cellulose. Eur. J. Biochem. 11: 395-399

Cammach, K.A. & H.E. Wade. 1965. The sedimentation behavior of ribonuclease - active and inactive ribosomes from bacteria. Biochem. J. 96: 671-680

Cammach, K.A., D.S. Miller & K.H. Grinstead. 1970. Physical properties of ribosomal ribonucleic acid isolated from bacteria deficient in ribonuclease I. Biochem. J. 117: 745-755

Cotter, R.I., P. McPhie & W.B. Gratzer. 1967. Internal organization of the ribosome. Nature (London) 216: 864-868

Cotter, R.I. & W.B. Gratzer. 1969. Conformation of ribosomal RNA of E. coli: an infrared analysis. Nature 221: 154-156

Cotter, R.I. & W.B. Gratzer. 1969. An infrared study of the conformation of RNA and protein in the ribosome. Eur. J. Biochem. 8: 352-356

Cox, R.A. & K. Kanagalingham. 1966. A study of the hydrolysis of unfractionated reticulocyte ribosomal ribonucleic acid by pancreatic ribonuclease and its relevance to secondary structure. Biochem. J. 103: 431-452

Cox, R.A. 1969. A study of the effects of reaction with formaldehyde on some optical and physical properties of reticulocyte ribosomes. Biochem. J. 114: 743-751

Cox, R.A. 1970. A spectrophotometric study of the secondary structure of ribonucleic acid isolated from the smaller and larger ribosomal subparticles of rabbit reticulocytes. Biochem. J. 117: 101-118

Dahlberg, A.E. & J.E. Dahlberg. 1975. Binding of ribosomal protein S1 of Escherichia coli to the 3' end of 16S RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 72: 2940-2944

Daya-Grosjean, L., R.A. Garrett, O. Pongs, G. Stöffler & H.G. Wittmann. 1972. Properties of the interaction of ribosomal protein S4 and 16S RNA in Escherichia coli revertants from streptomycin dependence to independence. Molec. Gen. Genet. 119: 277-286

Daya-Grosjean, L., J. Reinboldt, O. Pongs & R.A. Garrett. 1974. A study of the regions of ribosomal proteins S4, S8, S15 and S20 that interact with 16S RNA of Escherichia coli. FEBS Letters 44: 253-256

Ehresmann, B., J. Reinboldt & J.P. Ebel. 1975. Studies of the binding of E. coli ribosomal protein S4 to 16S rRNA after UV irradiation of the S4-16S rRNA complex. FEBS Letters 58: 106-111

Ehresmann, C., P. Stiegler, P. Fellner & J.P. Ebel. 1972. The determination of the primary structure of 16S ribosomal RNA of Escherichia coli. Biochimie 54: 901-967

Ehresmann, C., P. Stiegler, P. Fellner & J.P. Ebel. 1975a. The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of Escherichia coli. III. Further studies. Biochimie 57: 711-748

Ehresmann, C., P. Stiegler, G.A. Mackie, R.A. Zimmermann, J.P. Ebel & P. Fellner. 1975b. Primary sequence of the 16S ribosomal RNA of Escherichia coli. Nucleic Acids Res. 2: 265-278

Eickenberry, E.F., T.A. Bickle, R.R. Traut & C.A. Price. 1970. Separation of large quantities of ribosomal subunits by zonal ultrazentrifugation. Eur. J. Biochem. 12: 113-116

Fellner, P., C. Ehresmann & J.P. Ebel. 1972. The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of Escherichia coli. (1) Nucleotide sequence analysis of T_1 and pancreatic ribonuclease digestion products. Biochimie 54: 853-900

Franklin, R.E., A. Klug & K.C. Holmes. 1957. in: The Nature of Viruses (Ciba Symposium), London: Churchill, S. 39

Fresco, J.R., A. Adams, R. Ascione, D. Honley & T. Lindahl. 1966. Tertiary structure in transfer ribonucleic acids. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 527-537

Garrett, R.A., K.H. Rak, L. Daya & G. Stöffler. 1971. Ribosomal proteins XXIX. Specific protein binding sites on 16S rRNA of Escherichia coli. Molec. Gen. Genet. 114: 112-124

Gesteland, R.F. 1966. Isolation and characterization of ribonuclease I mutants of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 16: 67-84

Gould, H.J. & H. Simpkins. 1969. Studies on the secondary structure of ribosomal ribonucleic acid components of rabbit reticulocytes. Biopolymers 7: 223-239

Hall, B.D. & P. Doty. 1959. The preparation and physical chemical properties of ribonucleic acid from microsomal particles. J. Mol. Biol. 1: 111-126

Hardy, S.J.S., C.G. Kurland, P. Voynow & G. Mora. 1969. The ribosomal proteins of Escherichia coli I. Purification of the 30S ribosomal proteins. Biochemistry 8: 2897-2905

Held, W.A., B. Ballon, S. Mizushima & M. Nomura. 1974. Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from Escherichia coli: Further studies. J. Biol. Chem. 249: 3103-3111

Hill, W.E., G.P. Rosetti & K.E. van Holde. 1969. Physical studies of ribosomes from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 44: 263-277

Hindennach, J., G. Stöffler & H.G. Wittmann. 1971. Ribosomal protein IX. Isolation of proteins from 30S ribosomal subunits of Escherichia coli. J. Biochem. 23: 7-11

Hochkeppel, H.K., E. Spicer & G.R. Craven. 1976. A method of preparing Escherichia coli 16S RNA prossessing previously unobserved 30S ribosomal protein binding sites. J. Mol. Biol. 101: 155-170

Kallenbach, N.R. 1968. Theory of thermal transitions in low molecular weight RNA chains. J. Mol. Biol. 37: 445-466

Kaltschmidt, E. & H.G. Wittmann. 1970a. Ribosomal proteins VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. Ann. Biochem. 36: 401-413

Kaltschmidt, E. & H.G. Wittmann. 1970b. Ribosomal proteins XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of Escherichia coli as determined by two-dimensional gel electrophoresis. Proc. Nat. Sci. 67: 1276-1280

Kim, S.H., J.L. Sussman, F.L. Suddath, G.J. Quigley, A. McPherson, A.H.J. Wang, N.C. Seeman & A. Rich. 1974. The general structure of transfer RNA molecules. Proc. Nat. Acad. Sci. 71: 4970-4974

Klug, A., K.C. Holmes & J.T. Finch. 1961. X-ray diffraction studies on ribosomes from various sources. J. Mol. Biol. 3: 87-100

Kurland, C.G. 1960. Molecular characterization of ribonucleic acid from Escherichia coli ribosomes. Isolation and molecular weight. J. Mol. Biol. 18: 83-91

Kurland, C.G. 1974. The assembly of the 30S ribosomal subunit of Escherichia coli. J. Supramolecular Structure 2: 178-188

Ladner, J.E., A. Jack, J.D. Robertus, D. Rhodes, B.F.C. Clark & A. Klug. X-ray analysis of tRNA and its implication. Abstracts from "Tenth International Congress of Biochemistry" in Hamburg 1976. Lecture No. 03-5-L 020

Landy, A., J. Abelson, H.M. Goodman & J.D. Smith. 1967. Specific hybridization of tyrosine transfer ribonucleic acids with DNA from a transducing bacteriophage Ø 80 Carrying the amber suppressor gene su_{III}. J. Mol. Biol. 29: 457-471

Lemieux, G., J.-F. Lefevre & M. Daune. 1974. Effect of reconstitution conditions on the structure of Escherichia coli 30S ribosomal subunit components. Eur. J. Biochem. 49: 185-194

Lengyel, P. 1974. The process of translation: A bird's-eye view. Ribosomes, S. 13-52. Herausgeber: Nomura, M., A. Tissières & P. Lengyel. Cold Spring Harbor

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275

Mackie, G.A. & R.A. Zimmermann. 1975. Characterization of fragments of 16S ribonucleic acid protected against pancreatic ribonuclease digestion by ribosomal protein S4. J. Biol. Chem. 250: 4100-4112

McPhie, P. & W.B. Gratzer. 1966. The optical rotatory dispersion of ribosomes and their constituents. Biochemistry 5: 1310-1315

Midgley, J.E.M. 1965. The estimation of polynucleotide chain length by a chemical method. Biochim. Biophys. Acta 108: 340-347

Mizushima, S. & M. Nomura. 1970. Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from Escherichia coli. Nature 226: 1214-1218

Morris, D.R., J.E. Dahlberg & A.E. Dahlberg. 1975. Detection of cation-specific conformational changes in ribosomal RNA by gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. 2: 447-458

Muto, A., C. Ehresmann, P. Fellner & R.A. Zimmermann. 1974. RNA-protein interactions in the ribosome. I. Characterization and ribonuclease digestion of 16S RNA-ribosomal protein complexes. J. Mol. Biol. 86: 411-432

Nisbet, J.H. Slayter. 1975. Configurational changes in ribosomal RNA as a function of ionic conditions. Biochemistry 14: 4003-4010

Ortega, J.P. & W.E. Hill. 1973. A molecular weight determination of the 16S ribosomal ribonucleic acid from Escherichia coli. Biochemistry 12: 3241-3243

Parish, J.H. 1972. Principles and practice of experiments with nucleic acids, Kapitel: Intercalation, Seite 410-413, Verlag Longman

Peacock, A.C. & C.W. Dingman. 1968. Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. Biochemistry 7: 668-674

Pongs, O., K.H. Nierhaus, V.A. Erdmann & H.G. Wittmann. 1974. Active sites in Escherichia coli ribosomes. FEBS Letters 40: S 28 - S 37

Reinboldt, J. & E. Schiltz. 1973. The primary structure of ribosomal protein S4 from Escherichia coli. FEBS Letters 36: 250-252

Rinke, J.A. Yuki & R. Brimacombe. 1976. Studies on the environment of protein S7 within the 30S subunit of Escherichia coli ribosomes. Eur. J. Biochem. 64: 77-89

Robertus, J.D., J.E. Ladner, J.F. Finch, D. Rhodes, R.S. Brown, B.F. Clark & A. Klug. 1974. Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. Nature 250: 546-551

Salas, M., M.A. Smith, W.M. Stanley, A.J. Wahba & S. Ochoa. 1965. Direction of reading of the genetic message. J. Biol. Chem. 240: 3988-3995

Sanger, F., G.G. Brownlee & B.G. Barrell. 1965. A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. J. Mol. Biol. 13: 373-398

Santer, M. 1963. Ribosomal RNA on the surface of ribosomes. Science 141: 1049-1050

Scatchard, G. 1949. The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660-672

Schaup, H.W., M. Green & C.G. Kurland. 1970. Molecular interactions of ribosomal components. I. Identification of RNA binding sites for individual 30S ribosomal proteins. Molec. Gen. Genet. 109: 193-205

Schaup, H.W., M. Green & C.G. Kurland. 1971. Molecular interactions of ribosomal components. II. Site-specific complex formation between 30S proteins and ribosomal RNA. Mol. Gen. Genet. 112: 1-8

Schaup, H.W., M. Sogin, C. Woese & C.G. Kurland. 1971. Characterization of an RNA "binding site" for a specific ribosomal protein of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 114: 1-8

Schaup, H.W., M.L. Sogin, C.G. Kurland & C.R. Woese. 1973. Localization of a binding site for ribosomal protein S8 within 16S ribosomal ribonucleic acid of Escherichia coli. J. Bact. 115: 82-87

Schulte, C. & R.A. Garrett. 1972. Optimal conditions for the interactions of ribosomal protein S8 and 16S RNA and studies on the reaction mechanism. Mol. Gen. Genet. 119: 345-355

Schulte, C., C.A. Morrison & R.A. Garrett. 1974. Protein-ribonucleic acid interactions in Escherichia coli ribosomes. Solution studies on S4-16S ribonucleic acid and L24-23S ribonucleic acid binding. Biochemistry 13: 1032-1037

Schulte, C., E. Schiltz & R. Garrett. 1975. The characterization of a fragment of ribosomal protein S4 that is protected against trypsin digestion by 16S ribosomal RNA of Escherichia coli. Nucleic Acid Res. 2: 931-941

Spencer, M. & F. Poole. 1965. On the origin of crystallizable RNA from yeast. J. Mol. Biol. 11: 314-326

Spencer, M., W.J. Pigram & J. Littlechild. 1969. Studies on ribosomal RNA structure. 1. The isolation of crystallizable fragments. Biochim. Biophys. Acta 179: 348-359

Stein, A. & D.M. Crothers. 1976. Equilibrium binding of magnesium (II) by Escherichia coli $tRNA^{fMet}$. Biochemistry 15: 157-160

Stein, A. & D.M. Crothers. 1976. Conformational changes of transfer RNA. The role of magnesium (II). Biochemistry 15: 160-168

Stöffler, G. 1974. Structure and function of the Escherichia coli ribosome: Immunochemical analysis. Ribosomes, S.615-667. Herausg.: M. Nomura, A. Tissières & P. Lengyel. Cold Spring Harbor Laboratory

Tinoco, I., O.C. Uhlenbeck & M.D. Levine. 1971. Estimation of secondary structure in ribonucleic acids. Nature 230: 362-367

Tinoco, I., P.N. Borer, B. Dengler, M.D. Levine, O.C. Uhlenbeck, D.M. Crothers & J. Gralla. 1973. Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. Nature 246: 40-41

Thomas, G.J. & M. Spencer. 1969. Studies on ribosomal RNA structure. II. Secondary structures in solution of rRNA and crystallizable fragments. Biochim. Biophys. Acta 179: 360-368

Traub, P. & M. Nomura. 1968. Structure and function of Escherichia coli ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and protein. Proc. Nat. Acad. Sci. 59: 777-784

Traub, P. & M. Nomura. 1969. Studies on the assembly of ribosomes in vitro. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XXXIV: 63-67

Uchida, T., L. Bouen, H.W. Schaup, B.J. Lewis, L. Zablen & C. Woese. 1974. The use of ribonuclease U_2 in RNA sequence determination. J. Mol. Evol. 3: 63-77

Ungewickell, E., R. Garrett, C. Ehresmann, P. Stiegler & P. Fellner. 1975. An investigation of the 16S RNA binding sites of ribosomal proteins S4, S8, S15 and S20. Eur. J. Biochem. 51: 165-180

Waller, J.P. & J.I. Harris. 1961. Studies on the composition of the protein from E. coli ribosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47: 18-23

Waller, J.P. 1964. Fractionation of the ribosomal protein from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 10: 319-336

Wittmann, H.G. 1974. Purification and identification of Escherichia coli ribosomal proteins. Ribosomes, S.93-114. Herausg.: M. Nomura, A. Tissières & P. Lengyel. Cold Spring Harbor Laboratory

Wittmann, H.G. & B. Wittmann-Liebold. 1974. Chemical structure of bacterial ribosomal proteins. Ribosomes, S.115-140. Herausg.: M. Nomura, A. Tissières & P. Lengyel. Cold Spring Harbor Laboratory

Wittmann, H.G. 1976. The Seventh Sir Hans Krebs Lecture. Structure, function and evolution of ribosomes. Eur. J. Biochem. 61: 1-13

Zimmermann, R.A., A. Muto, P. Fellner, C. Ehresmann & C. Branlant. 1972. Location of ribosomal protein binding sites on 16S ribosomal RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 69: 1282-1286

Zimmermann, R.A., G.A. Mackie, A. Muto, R.A. Garrett, E. Ungewickell, C. Ehresmann, P. Stiegler, J.P. Ebel & P. Fellner. 1975. Location and characteristics of ribosomal protein binding sites in the 16S RNA of Escherichia coli. Nucleic Acids Res. 2: 279-302

Zubay, S. & M.H.F. Wilkins. 1960. X-ray diffraction studies of the structure of ribosomes from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 2: 105-112

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin, Abt. Wittmann, angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Wittmann und Herrn Dr. R.A. Garrett danke ich für die großzügige Unterstützung meiner Arbeit.

Frau Dr. C. Ehresmann, Herrn Dr. P. Fellner und Herrn P. Stiegler, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du C.N.R.S., Straßburg, Frankreich, danke ich für gute Zusammenarbeit.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Garrett danke ich für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Außerdem danke ich Frau J. Popella und Frau E. Philippi für die sehr gute Ausführung der photographischen Arbeiten.

Lebenslauf

6.1.1950	geboren in Berlin als Sohn des Drogisten Hans-Joachim Ungewickell und seiner Ehefrau Brigitte, geb. Henschke
1956-1962	Besuch der Grundschule in Berlin
1962-1969	Besuch des math.-naturw. Zuges der Lilienthal-Oberschule in Berlin, abgeschlossen mit dem Zeugnis der Hochschulreife
1969-1974	Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin
1971	Diplomvorprüfung
1972-1973	Anfertigung der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin, Abteilung Wittmann, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.G. Wittmann in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. R.A. Garrett
1974	Diplomprüfung und Beginn der Dissertationsarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.G. Wittmann in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. R.A. Garrett
1975	Seit dem 14.3.1975 bin ich verheiratet.

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30